

Tesis Doctoral

# Rol de HO-1 en la regulación de la inflamación asociada al cáncer de próstata. Compartimentalización subcelular y función

Elguero, María Belén

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Elguero, María Belén. (2013). Rol de HO-1 en la regulación de la inflamación asociada al cáncer de próstata. Compartimentalización subcelular y función. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Elguero, María Belén. "Rol de HO-1 en la regulación de la inflamación asociada al cáncer de próstata. Compartimentalización subcelular y función". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



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

**“Rol de HO-1 en la regulación de la inflamación asociada al cáncer de próstata. Compartimentalización subcelular y función”**

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

**María Belén Elguero**

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

Directora Asistente de tesis: **Dra. Adriana De Siervi**

Consejera de Estudios: **Dra. Elba Susana Vazquez**

Laboratorio de Inflamación y Cáncer, Departamento de Química Biológica,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.  
IQUIBICEN – CONICET

Buenos Aires, 2013

## RESUMEN

### **Rol de HO-1 en la regulación de la inflamación asociada al cáncer de próstata.**

#### **Compartimentalización subcelular y función**

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por esta enfermedad entre los hombres occidentales. Los andrógenos y el receptor de andrógenos (AR) son críticos para el desarrollo del PCa. El AR recluta varios co-activadores/co-represores y factores de transcripción modificando la expresión de genes blanco. Se han identificado varios mecanismos que activan al AR entre ellos la vía de señalización de STAT3. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron la expresión nuclear de HO-1 en carcinomas primarios de próstata. In vitro la inducción de HO-1 disminuyó la proliferación, la invasión y la migración celular y retardó el crecimiento tumoral y la angiogénesis in vivo. Nuestra hipótesis es que HO-1 podría actuar como un co-regulador de receptores nucleares o bien modificar el microambiente tumoral modulando la expresión de factores que actuarían como co-reguladores. En este trabajo de tesis nos propusimos investigar si HO-1 afecta la actividad transcripcional del AR a través del eje STAT3. Demostramos que la inducción de HO-1 en las células de PCa reprime la activación del AR, disminuyendo la actividad del promotor y los niveles del ARNm del antígeno prostático específico (PSA). Comprobamos que la sobre-expresión de HO-1 induce arresto del ciclo celular en G2/M. Mediante inmunoprecipitación de la cromatina determinamos que HO-1 se asocia a promotores génicos, revelando una nueva función nuclear para esta proteína. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación mostramos que HO-1 y STAT3 interactúan directamente. Por medio de microscopía confocal demostramos que HO-1 provoca la retención citoplasmática de STAT3. El tratamiento con hemina (inductor específico de HO-1) impidió la inducción de la expresión de los genes targets de STAT3, coincidente con la disminución de los niveles de pSTAT3 en el núcleo. Estudios in vivo confirmaron la reducción de la localización nuclear de STAT3 en los xenotransplantes de células PC3 que sobre-expresan HO-1. Adicionalmente, NFκB, un factor relevante en la inflamación y que forma complejos con STAT3, también queda inactivo retenido en el citoplasma cuando se induce HO-1. Estos resultados proveen una función nueva para HO-1 reprimiendo la actividad transcripcional del AR en PCa e interfiriendo con la señalización de STAT3. Estos hallazgos sustentan nuestra proposición acerca del nuevo rol que posee HO-1, más allá de su actividad catalítica.

**Palabras claves:** cáncer de próstata, hemo oxigenasa-1, STAT3, receptor de andrógenos, inflamación.

**ABSTRACT****Rol of HO-1 in the regulation of prostate cancer associated inflammation. Subcellular compartmentalization and function**

Activation of the androgen receptor (AR) is a key step in the development of prostate cancer (PCa). Several mechanisms have been identified in AR activation, among them signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling. Recent studies suggest that heme oxygenase 1 (HO-1) may play a key role in PCa, independent of its catalytic function. We sought to explore whether HO-1 operates on AR transcriptional activity through the STAT3 axis. Our results display that HO-1 induction in PCa cells represses AR activation by decreasing the prostate-specific antigen (PSA) promoter activity and mRNA levels. We also show that HO-1 over expression in PC3 cells induces the arrest of the cell cycle in G2/M. Strikingly, this is the first report to show by chromatin immunoprecipitation analysis that HO-1 associates to gene promoters, revealing a novel function for HO-1 in the nucleus. Furthermore, HO-1 and STAT3 directly interact as determined by co-immunoprecipitation studies. Forced expression of HO-1 increases in vitro and in vivo STAT3 cytoplasmic retention. When PCa cells were transfected with a constitutively active STAT3 mutant, PSA and STAT3 downstream target genes were abrogated under hemin treatment. Additionally, a significant decrease in pSTAT3 protein levels was detected in the nuclear fraction of these cells. Confocal microscopy images exhibit a decreased rate of AR/STAT3 nuclear co-localization under hemin treatment. The inflammatory key factor NFκB was shown to interact with both STAT3 and AR and its nuclear translocation was impaired by hemin treatment. These results provide a novel function for HO-1 down-modulating AR transcriptional activity in PCa cells, interfering with STAT3 signaling, evidencing HO-1 role beyond heme degradation.

**Key words:** prostate cancer, heme oxygenase-1, STAT3, androgen receptor, inflammation.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de Tesis de Doctorado.

También quiero agradecer a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica y a CONICET por aportar la financiación para este proyecto.

Agradezco a mi Directora, la Dra. Elba Vazquez, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, pero especialmente por su apoyo y guía en todo momento, por ser siempre tan generosa y un excelente ejemplo a seguir mostrándonos día a día que la perseverancia y el amor por lo que uno hace convierten cualquier objetivo en realidad, por brindarme su experiencia día a día tanto laboral como personalmente y acompañarme con las palabras adecuadas en cada momento, en este camino tan difícil con altibajos como es la ciencia.

Agradezco a mi segunda directora, la Dra. Adriana De Siervi, por ser mi guía en momentos difíciles, por darme su apoyo cuando las cosas no salían y festejar conmigo los éxitos. Por tenerme tan presente a pesar de estar ocupada con muchas cosas, brindándome ideas y escuchándome. Gracias Elba y Adri por apoyarme y guiarme en esta etapa de mi vida!

No me alcanzan las palabras para agradecer a mis compañeros de laboratorio, por hacer de esta experiencia algo único, por haber tenido la posibilidad de entender lo que es realmente trabajar en equipo, todos aportaron lo mejor de sí y compartimos juntos más que resultados, cada uno a su forma, me enseñaron a crecer en muchos aspectos, gracias por ser tan solidarios y estar siempre dispuestos a ayudar. Gracias Javi, Geral, Pao, Flor, Cris, Mechi, Daia, Felipe, Tefi, Ale y Angie, por toda su colaboración y apoyo, por brindar lo mejor de cada uno siempre y convertir el labo en una segunda familia. Gracias Geral por iniciarme en este largo camino de la ciencia enseñándome tu visión diferente a cada momento y por tu gran ayuda en estos pasos finales. Especialmente gracias Mer, Flor y Pao, por ser más que compañeras amigas, por el gran apoyo emocional y por sus sabios y sinceros consejos, gracias por estar presentes en los momentos más difíciles y por disfrutar conmigo los momentos más felices.

Agradezco al Dr. Federico Coluccio por compartir sus aparatos y reactivos y a su grupo de trabajo Jime, Fede, Fran, Lucía, Amparo por la buena onda, especialmente a Martín por su gran ayuda con el microscopio, las imágenes y por las enriquecedoras charlas de horas;

también quiero agradecer a Jime Giudice por sus consejos personales y profesionales y su ayuda con el procesamiento de imágenes.

Agradezco a la Dra. Mónica Kotler por brindarnos su solidaridad y a las chicas Roxi y Agus por compartir charlas, consejos y reactivos.

Agradezco a los Doctores Eduardo Cánepa, Susana Correa, Mariana Bermúdez, Adalí Pecci, Edith Kordon, Omar Cosso, Alejandra Guberman, Diego Laderach y Daniel Compagno, por su generosidad para compartir conocimientos, aparatos y reactivos que permitieron desarrollar este trabajo.

Quiero agradecer a los chicos vecinos y no tan vecinos de labo: Noe, Clau, Ari, Charly, Sabri, el Chino, Cris, Marcos, Cari, Diego, Luciana, Andrés, Florencia, Dieguito, Martincito, Anita Q, Vicky Goddio, Johi, Nadia, Lautaro, Pau, Naty F. y Lourdes, a los chicos de orgánica y también a los chicos del cuarto piso: Silvi, Fernanda, Fátima, Juli, Gise, Ale y Lucas, por compartir en estos cuatro años experiencias y por hacer del CM1, y de los distintos laboratorios, un lugar muy agradable de trabajo.

Agradezco al Dr. Roberto Meiss por compartir su invaluable experiencia y conocimiento y por los múltiples aportes a esta Tesis.

Agradezco a la Dra. Nora Navone y al Dr. Gabriel Rabinovich por aportar su sabiduría y por su importante participación en la discusión de este trabajo.

Agradezco especialmente a todas las personas que constituyeron el apoyo emocional que me impulsó siempre a seguir adelante:

a mis amigos “de misiones”: Luciano, Martín, la Pato, el Negro, Yae, Andre y Checho por compartir esta etapa de mi vida y por seguir creciendo juntos.

a mis amigas que fueron apareciendo en los diferentes lugares y etapas de mi vida, por atravesar juntas todas las experiencias que nos fueron definiendo como personas. Gracias Femi, Yae, Andre, Nadia y Adri por compartir en esta etapa tristezas y alegrías y por demostrar que no hay distancias para la amistad.

un gracias enorme a mis “compañeros de andarivel” Marian, Marie y Gonza por ayudarme a desconectarme del trabajo aguantándome en estos últimos pasos de locura mientras finalizaba la tesis y por abrirme paso a una nueva amistad.

Y el mayor de todos mis agradecimientos es a mi Familia completa:

Gracias Papá, Mamá y Euge por ser mi soporte, por creer siempre en mí, por acompañar siempre mis pasos con mucho amor haciéndome sentir querida, confiada y segura, por enseñarme a escuchar, a aprender de otros, a perseverar, a ser paciente y a creer con convicción. A la parte más reciente de la familia, mi cuñado Joe, por compartir esta última etapa y por transmitirme siempre una visión alternativa de la vida.

Gracias Fede, mi futura familia, por acompañarme, por creer en mí, por crecer conmigo, por brindarme todo tu amor y cariño, por ser incondicional y por ayudarme a disfrutar lo hermoso de cada etapa.

Gracias a mi gran familia tíos y primos: Cármen, Negra, Marta, Lale, Mario, Carlos, Quitín, Cielo, Ara, Caro, Guille, Ara, Vivi, Gustavo, Fabi, Leo, a los más chiquitines: Lara, Vale, Leo, Luchi, Dante, Uma y a todos los que me quedaron sin nombrar, Gracias por apoyarme siempre, por transmitirme la experiencia acumulada a lo largo de sus vidas y por compartir con alegría cada uno de mis logros.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que participaron de uno u otro modo tanto en el ámbito laboral como personal para la conclusión de esta etapa.

**GRACIAS!**

*A mi familia y a Fede*



<b>PUBLICACIONES</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>I. CÁNCER DE PRÓSTATA (PCa)</b>	<b>6</b>
<b>I.1 Epidemiología</b>	<b>6</b>
<b>I.2 La próstata</b>	<b>6</b>
<b>I.3 Los andrógenos y el receptor de andrógenos</b>	<b>8</b>
<b>I.4 El antígeno prostático específico (PSA)</b>	<b>10</b>
Regulación por andrógenos del gen del PSA	11
PSA y Diagnóstico del PCa	11
<b>I.5 Etiología y desarrollo del PCa</b>	<b>13</b>
Grado de Gleason del PCa	13
Relación entre la atrofia inflamatoria proliferativa y el PCa	14
Procesos que promueven el PCa	15
Alteraciones moleculares en el PCa	17
Evolución del PCa	18
<b>I.6 Mecanismos involucrados en la independencia de andrógenos del PCa</b>	<b>19</b>
<b>I.7 La inflamación y el PCa</b>	<b>21</b>
Inflamación y Cáncer	21
Rol de la inflamación en el PCa	21
<b>II HO-1</b>	<b>25</b>
<b>II.1 Generalidades</b>	<b>25</b>
HO-1 y su localización	26
Regulación de la expresión de HO-1	28
<b>II.2 Rol fisiológico de HO-1 en procesos celulares</b>	<b>30</b>
HO-1 y la inflamación	31
HO-1 y la angiogénesis	33
HO-1 en la apoptosis y la proliferación	34
HO-1 y el ciclo celular	35
<b>II.3 HO-1 y el PCa</b>	<b>37</b>
<b>III. STAT3</b>	<b>38</b>
<b>III.1 Vía de señalización de STAT3</b>	<b>39</b>
<b>III.2 STAT3 y la carcinogénesis</b>	<b>40</b>
<b>III.3 STAT3 y el PCa</b>	<b>41</b>

---

Activación de la señalización de STAT por IL-6 en PCa	41
<b>III.4 El microambiente inflamatorio y la tumorigénesis: NFκB y STAT3</b>	<b>42</b>
<b>III.5 Interacción entre STAT3 y el AR</b>	<b>44</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>I. HIPÓTESIS</b>	<b>48</b>
<b>II. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>49</b>
<b>III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>50</b>
<b>I. MATERIALES</b>	<b>51</b>
<b>I.1 Reactivos y drogas</b>	<b>51</b>
<b>I.2 Reactivos para cultivo</b>	<b>51</b>
<b>I.3 Anticuerpos</b>	<b>51</b>
<b>I.4 Oligonucleotidos</b>	<b>52</b>
<b>I.5 Líneas celulares</b>	<b>52</b>
<b>I.6 Plásmidos</b>	<b>53</b>
<b>II. METODOS</b>	<b>54</b>
<b>II.1 Cultivo celular</b>	<b>54</b>
II.1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares	54
II.1.2 Preservación criogénica	54
II.1.3 Tratamientos con hemina, testosterona e IL-6	55
<b>II.2 Preparación de vectores de expresión</b>	<b>56</b>
II.2.1 Preparación de bacterias competentes	56
II.2.2 Transformación de bacterias competentes	56
II.2.3 Aislamiento del ADN plasmídico	56
<b>II.3 Ensayos de genes reporteros</b>	<b>57</b>
II.3.1 Transfección de células para ensayo de gen reportero	57
II.3.2 Ensayo de la actividad de la luciferasa	57
<b>II.4 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo</b>	<b>58</b>
<b>II.5 Análisis de expresión a nivel transcripcional</b>	<b>58</b>
II.5.1 Transfección de células para obtención de ARN	58
II.5.2 Transducción de células	59
II.5.3 Aislamiento del ARN	60
II.5.4 Cuantificación y pureza del ARN	60

II.5.5 RT-PCR	60
II.5.6 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	61
II.5.7 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	63
Crosslink	63
Electroforesis en gel de agarosa	64
Inmunoprecipitación	64
Amplificación del ADN del ChIP	65
<b>II.6 Análisis de proteínas</b>	<b>67</b>
II.6.1 Preparación de lisados celulares	67
Extractos proteicos totales	67
Fraccionamiento núcleo-citoplasma	68
II.6.2 Medición de la concentración de proteínas	68
II.6.3 SDS-PAGE y Western blot	68
Preparación de las muestras	68
Electroforesis	68
Transferencia a membrana de nitrocelulosa	68
Inmunodetección de proteínas	69
II.6.4 Co-inmunoprecipitación	69
II.6.5 Inmunofluorescencia e inmunocitoquímica	70
Inmunocitoquímica	70
Inmunofluorescencia y microscopía	70
Procesamiento de imágenes	71
Segmentación (núcleo-citoplasma)	72
Estimación de la distribución intracelular de STAT3	72
<b>II.7 Muestras de tumores de líneas de cáncer de próstata humano creciendo como xenotransplantes en ratones nu/nu</b>	<b>72</b>
II.7.1 Histología e inmunohistoquímica	72
<b>II.8 Análisis estadístico</b>	<b>73</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>74</b>
<b>I. EFECTOS DE HO-1 SOBRE EL CICLO CELULAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA</b>	<b>76</b>
<b>I.1 HO-1 induce la acumulación de la población celular en la fase G2/M del ciclo</b>	<b>76</b>
<b>I.2 HO-1 modifica los niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular</b>	<b>78</b>
<b>II. EFECTOS DE HO-1 SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA</b>	<b>79</b>
<b>II.1 HO-1 reprime la transcripción del PSA en respuesta a testosterona</b>	<b>79</b>
<b>II.2 HO-1 no modifica ni la expresión ni la localización celular del AR en respuesta a testosterona</b>	<b>82</b>

<b>III. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN NUCLEAR DE HO-1 Y SU ASOCIACIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA</b>	<b>85</b>
<b>III.1 HO-1 se asocia a los promotores génicos de MMP9, uPA y PSA en respuesta a testosterona</b>	<b>85</b>
<b>III.2 HO-1 no se asocia al AR</b>	<b>86</b>
<b>III.3 HO-1 se asocia a STAT3</b>	<b>87</b>
<b>IV. EFECTO DE HO-1 EN LA SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA</b>	<b>90</b>
<b>IV.1 HO-1 modula negativamente a STAT3 en células de PCa sensibles a andrógenos</b>	<b>90</b>
<b>IV. 2 HO-1 induce la retención citoplasmática de STAT3 en células de PCa sensibles a andrógenos</b>	<b>92</b>
<b>IV. 3 HO-1 reprime la expresión de genes regulados por STAT3 en células de PCa sensibles a andrógenos</b>	<b>93</b>
<b>IV. 4 HO-1 disminuye la expresión de STAT3 en células de PCa insensibles a andrógenos</b>	<b>96</b>
<b>V. EFECTO DE HO-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE STAT3 IN VIVO</b>	<b>97</b>
<b>V.1 HO-1 promueve la retención citoplasmática de STAT3 in vivo en tumores de PCa xenotransplantados</b>	<b>97</b>
<b>VI. EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE STAT3 Y DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA</b>	<b>99</b>
<b>VI. 1 HO-1 induce la retención citoplasmática de STAT3 en células de PCa estimuladas con IL-6 y activadas con testosterona</b>	<b>100</b>
<b>VI. 2 STAT3 media la represión por HO-1 de la vía de señalización del AR</b>	<b>102</b>
<b>VI. 3 HO-1 disminuye la co-localización de STAT3 y AR</b>	<b>106</b>
<b>VI. 4 HO-1 disminuye la asociación entre STAT3 y AR</b>	<b>109</b>
<b>VII. EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE HO-1 EN LA VÍA DE SEÑALIZACION DE NFκB</b>	<b>111</b>

<b>VII. 1 HO-1 disminuye la expresión de p65 en células de PCa sensibles a andrógenos</b>	<b>112</b>
<b>VII. 2 HO-1 reduce la localización nuclear de p65 en células de PCa insensibles a andrógenos</b>	<b>112</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>114</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>127</b>

## PUBLICACIONES

Los contenidos presentes en este trabajo de Tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

1. **Elguero B**, Gueron G, Giudice J, Toscani M, De Luca P, Zalazar F, ColuccioLeskow F, Meiss R, Navone N, De Siervi A, Vazquez E. “Unveiling the association of STAT3 and HO-1 in prostate cancer: role beyond heme degradation”. *Neoplasia* (2012) 14, 1043–1056.

Además he participado en trabajos que dieron origen a las siguientes publicaciones de gran relevancia para este trabajo de tesis.

- 1 Ferrando M, Gueron G, **Elguero B**, Giudice J, Salles A, Leskow FC, Jares-Erijman EA, Colombo L, Meiss R, Navone N, De Siervi A, Vazquez E. “Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer” *Angiogenesis* (2011) 14(4), 467-79.
- 2 Gueron G, De Siervi A, Ferrando M, Salierno M, De Luca P, **Elguero B**, Meiss R, Navone N, Vazquez E. “Critical role of endogenous heme oxygenase 1 (HO-1) as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells,”. *Mol Cancer Res.* (2009) 7(11), 1745-55.

## ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**AP-1:** proteína activadora 1  
**AR:** receptor de andrógenos  
**ARE:** elemento de respuesta andrógenos  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**Bach:** *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*  
**BCA:** ácido bicinconínico  
**Bcl xL:** Linfoma de células B extra largo  
**Bcl-2:** proteína 2 de linfoma de células B  
**HPB:** hiperplasia benigna de la próstata  
**bPSA:** antígeno prostático específico unido  
**BSA:** suero albumino bovino  
**BVR:** biliverdina reductasa  
**CDKs:** quinasas dependientes de ciclinas  
**cDNA:** DNA copia  
**ChIP:** inmunoprecipitación de la cromatina  
**CO:** monóxido de carbono  
**COX2:** ciclo-oxigenasa 2  
**CREB:** elementos de respuesta a cAMP  
**CRPC:** cáncer de próstata resistente a la castración  
**DAB:** p-dimetilaminoazobenzeno  
**DHT:** dihidrotestosterona  
**DMSO:** dimetil sulfóxido  
**DNasa:** deoxirribonucleasa  
**dNTP:** deoxinucleótido trifosfato  
**DRE:** examen rectal digital  
**DTT:** Ditiotreitól  
**ECL:** quimioluminiscencia aumentada  
**ECM:** matriz extracelular  
**EDTA:** etilen-diaminotetra-acido acético  
**EGF:** factor de crecimiento epidérmico  
**EGTA:** Ácido etilenglicoltetraacético  
**EST:** secuencia codificante del virus de la eritroblastosis E26  
**FACS:** fluorescence-activated cell sorter analysis  
**FGF:** factor de crecimiento fibroblástico  
**fPSA:** antígeno prostático específico libre (free)  
**Gal4:** Galectina 4  
**GR** receptor de glucocorticoides  
**GST:** glutatión-s-transferasa  
**HGPIN:** neoplasia intraepitelial prostática de alto grado  
**HIF:** factor inducible por hipoxia  
**Hmox1:** gen de hemo oxigenasa-1  
**HO-1:** hemo oxigenasa 1

**HSP:** proteínas de shock térmico  
**IF:** inmunofluorescencia  
**IGF:** factor de crecimiento tipo insulina  
**IL:** Interleuquina  
**IP:** inmunoprecipitación  
**JAK:** janus quinasa  
**JNK:** c-jun quinasa N terminal  
**Keap1:** *kelch-like ECH-associated protein-1*  
**KLK3:** calicreína K3  
**LDS:** lauril duodecil sulfato  
**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos  
**MARE:** elemento de respuesta a proteínas Maf  
**miRNAs:** microRNAs  
**MMP:** metaloproteinasas  
**mRNA:** RNA mensajero  
**mTOR:** mammalian target of rapamycin  
**NF-E2/Nrf2:** factor nuclear eritroide 2  
**NF-κB:** factor nuclear kappa B  
**Nkx3.1:** NK3 homeobox 1  
**NO:** óxido nítrico  
**NOS:** óxido nítrico sintetasa  
**NOX:** NAD(P)H oxidasa  
**PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida  
**PBS:** buffer fosfato salino  
**PCa:** cáncer de próstata  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas \*  
**PIA:** atrofia inflamatoria proliferativa  
**PIAS** proteínas inhibidoras de STAT3 activado  
**PIN:** neoplasia prostática intraepitelial  
**PMN:** polimorfonucleares  
**PMSF:** Fenil metil sulfonil fluoruro  
**PSA:** antígeno prostático específico  
**pSTAT3:** factor transductor de señales y activador de la transcripción 3 fosforilado  
**PTEN:** homólogo de fosfatasa y tensina  
**REL:** retículo endoplasmático liso  
**RELA/p65:** subunidad del complejo NFκB  
**RNasa:** ribonucleasa  
**ROS:** especies reactivas del oxígeno  
**RT:** transcriptasa reversa  
**SD:** desviación estándar  
**SDS:** duodecil sulfato de sodio  
**SFBch:** suero fetal bovino charcolizado  
**shRNA:** short hairpin RNA  
**SnPP:** dicloruro de estaño (IV) protoporfirina IX



**SOCS** supresores de la señalización de citoquinas  
**SP1**: Proteína específica-1  
**STAT3**: factor transductor de señales y activador de la transcripción 3  
**StRE**: elemento de respuesta a estrés  
**TAE**: tris acetato EDTA  
**TAM**: macrófagos asociados al tumor  
**TBS**: tris bufer salino  
**TBS-T**: tris bufer salino Tween-20  
**TGF $\beta$** : factor de crecimiento transformante beta  
**TMPRSS2**: serin-proteasa transmembrana  
**TNF $\alpha$** : factor de necrosis tisular alfa  
**Tris**: tris (hydroximetil) aminoetano  
**TritonX-100**: octil fenoxi polietoxietanol  
**Tween-20**: polioxietileno (20) sorbitan monolaurato  
**uPA**: activador del plasminógeno tipo urokinasa  
**uPAR**: receptor del activador del plasminógeno tipo urokinasa  
**VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular  
**VSMC**: células vasculares del músculo liso  
**Wnt**: del inglés Int (integration) y Wg (wingless)

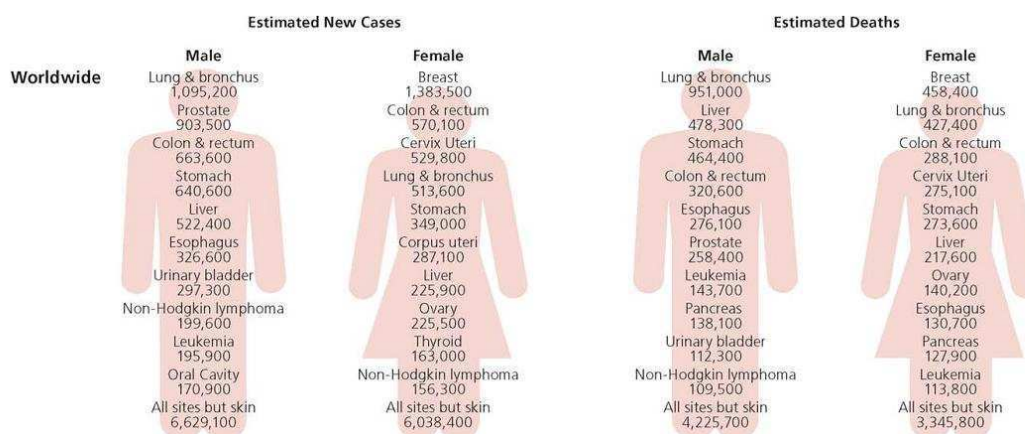
# **INTRODUCCIÓN**

---

## I. CÁNCER DE PRÓSTATA

### I.1 Epidemiología

El cáncer de próstata (PCa) es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado y la sexta causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial, según datos estimados por el proyecto GLOBOCAN en 2008 (Jemal et al. 2011) (Fig. 1). En Argentina, de acuerdo a publicaciones del Ministerio de Salud de la Nación del año 2011, constituye la segunda causa de muerte por cáncer considerando a la población masculina (Dirección de estadísticas e información de salud, Ministerio de Salud, Argentina 2011).



**Figura 1.** Tasas de incidencia y muerte en el mundo estimadas por el Proyecto GLOBOCAN 2008 (Figura extraída de Jemal y colaboradores (Jemal *et al.* 2011)).

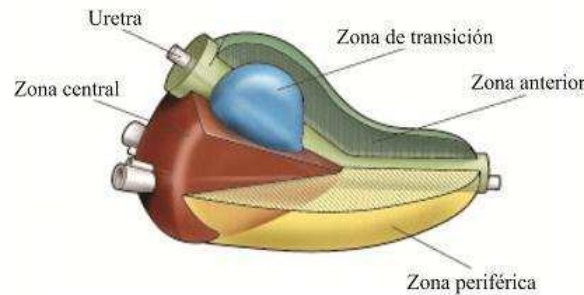
### I.2 La próstata

La próstata es una glándula exocrina accesoria del sistema reproductor masculino, está situada en frente del recto, debajo de la vejiga, y rodea a la uretra. Su función es la secreción de varios componentes del fluido seminal.

En la próstata humana pueden distinguirse 4 zonas anatómicas (Fig. 2):

- 1- **zona periférica:** representa el 70% de la glándula. Es la zona donde ocurre con mayor frecuencia el PCa (De Marzo et al. 2007).
- 2- **zona central:** representa el 25% del volumen prostático y contiene el ducto eyaculatorio. Usualmente es la zona donde ocurren los procesos inflamatorios (prostatitis).

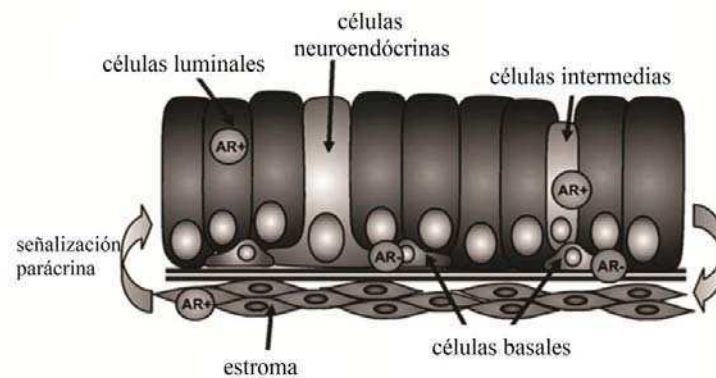
- 3- **zona de transición:** representa solo el 5% de la glándula. En esta zona es donde ocurre con mayor frecuencia la hipertrofia prostática benigna (HPB).
- 4- **Zona anterior:** es predominantemente fibro-muscular sin estructuras glandulares.



**Figura 2.** Zonas de la próstata (Figura adaptada de [http://www.bkmed.com/prostate\\_en.htm](http://www.bkmed.com/prostate_en.htm)).

El epitelio prostático es estratificado y en él se pueden distinguir al menos 4 tipos celulares (van Leenders G. et al. 2000; Long et al. 2005). Posee una capa de células columnares altas, las células secretorias luminales, que son células que expresan al receptor de andrógenos (AR), necesitan de las hormonas para sobrevivir y en respuesta a ellas producen y secretan el antígeno prostático específico (PSA) y la fosfatasa ácida prostática. Estas células también expresan los marcadores epiteliales cito-queratinas 8 y 18. Por debajo de ellas hay una capa de células cuboidales, las células basales, las cuales se considera que son el componente proliferativo de la próstata (Bonkhoff et al. 1994), no expresan el AR, pero expresan factores como la proteína de defensa anti-oxidante glutatión-S-transferasa (GST) que protege frente al daño en el ADN y la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Bui y Reiter 1998); (De Marzo et al. 1998). El tercer tipo celular corresponde a las células neuroendócrinas, que se encuentran dispersas entre las basales y luminales, son AR negativas y secretan neuropéptidos (Shen y Abate-Shen 2010). También existe una población heterogénea de células, llamadas células intermedias que expresan un fenotipo intermedio entre las células basales progenitoras y las células secretorias diferenciadas terminalmente (Long et al. 2005). Actualmente se reconoce la existencia de un tipo celular adicional, las células madre prostáticas, las cuales no requieren de andrógenos para sobrevivir y tienen la capacidad de regenerar el epitelio tras un ciclo de privación de andrógenos cuando las células luminales mueren (Collins y Maitland 2006). Aún está en discusión cual de todos estos tipos celulares sería el candidato principal para desarrollar el PCa (Garber 2010) (Fig. 3).

Este epitelio está inmerso en un estroma fibro-muscular con el cual interactúa mediante factores de crecimiento y hormonas secretados localmente. Las células epiteliales poseen receptores hormonales de estrógenos y andrógenos, y responden a hormonas produciendo factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento epitelial (EGF), los cuales afectan de manera autocrina al estroma (Long et al. 2005; Sampson et al. 2007). Los fibroblastos estromales del mismo modo poseen AR, receptor de estrógenos y en respuesta a hormonas esteroides producen factores de crecimiento estromales que afectan el crecimiento y la diferenciación del epitelio (Sampson et al. 2007). Por este motivo cada vez se le da más importancia en la glándula prostática al estroma y su interacción con el epitelio, tanto a nivel fisiológico como patológico (Chung et al. 2006; Cano et al. 2007; Barron y Rowley 2012).



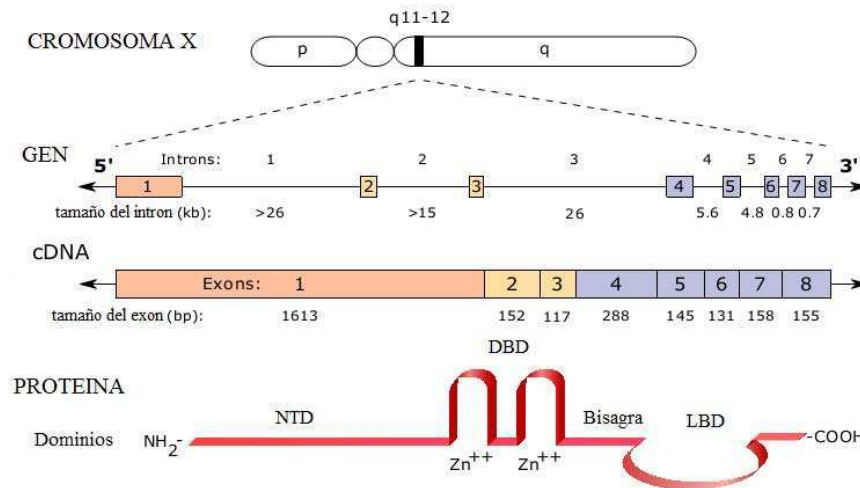
**Figura 3.** Esquema de los tipos celulares de la próstata (Figura adaptada de Garber (Garber 2010)).

### I.3 Los andrógenos y el receptor de andrógenos

Tanto el epitelio prostático como su estroma necesitan andrógenos para su correcto desarrollo y funcionamiento. Los andrógenos son hormonas sexuales masculinas producidas principalmente por los testículos. Estas hormonas regulan el desarrollo y la diferenciación de la próstata. El principal andrógeno circulante en el hombre es la testosterona, la cual es secretada por los testículos hacia la sangre donde viaja unida a globulina. Al llegar a las células prostáticas la testosterona libre difunde al interior de la célula y es convertida a dihidrotestosterona (DHT) por la enzima  $5\alpha$ -reductasa. La DHT es la forma activa del ligando y tiene más afinidad por el AR que la testosterona.

Los efectos biológicos de los andrógenos son mediados por el AR, que es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de los receptores nucleares activados por

ligandos. Similar a otros receptores esteroides, el AR posee dominios funcionales definidos como dominio N-terminal (NTD), dominio de unión al ADN (DBD) constituido por dos motivos dedos de zinc, dominio de unión al ligando (LBD) y una región bisagra entre los dominios DBD y LBD (Fig. 4). A diferencia de las demás regiones que están evolutivamente conservadas, el dominio NTD es muy variable (Koochekpour 2010).



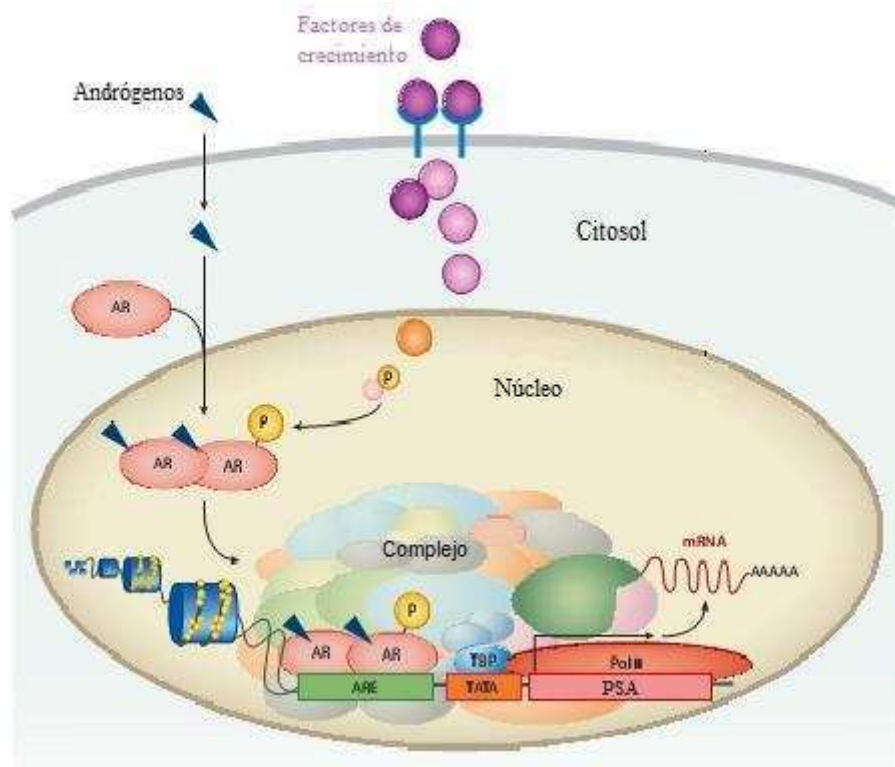
**Figura 4.** Localización y estructura del AR humano.

El gen del AR se localiza en el brazo largo del cromosoma X (panel superior), posee 8 exones separado por sus intrones (panel medio). Esquema de los principales dominios proteicos (panel inferior) (Esquema adaptado de [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Functional\\_domains\\_of\\_the\\_human\\_androgen\\_receptor.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Functional_domains_of_the_human_androgen_receptor.svg)).

El AR se encuentra en el citosol y cuando la DHT se une, este receptor se activa, se disocia de proteínas chaperonas, se dimeriza y se transloca al núcleo. El complejo activo del AR y su ligando, en asociación con otros factores (co-reguladores) se une como dímero a secuencias consenso en el ADN, llamadas sitios ARE (elemento respondedor a andrógenos), regulando la transcripción de genes, como por ejemplo el PSA y factores de crecimiento que pueden afectar al estroma y a las propias células prostáticas (Matsumoto et al. 2013) (Fig. 5).

Varios miembros de la superfamilia de receptores esteroides reconocen AREs similares, sin embargo, cada receptor puede activar genes blanco, tejido específico, bajo condiciones fisiológicas determinadas. Esta precisión en la respuesta transcripcional del receptor se debe a las diversas interacciones entre el AR, los factores generales de la transcripción, co-reguladores y otros factores involucrados también en otras vías de señalización (Heemers y Tindall 2007; Koochekpour 2010).

En la última década se han descubierto numerosos factores de transcripción que pueden interactuar física y funcionalmente con el AR regulando la respuesta transcripcional de sus genes blanco (Heemers y Tindall 2007). Así la respuesta a los andrógenos de forma precisa y delimitada a una condición fisiológica, requiere la asociación adecuada de co-reguladores y la acción concertada de distintas vías y procesos de señalización en la célula.



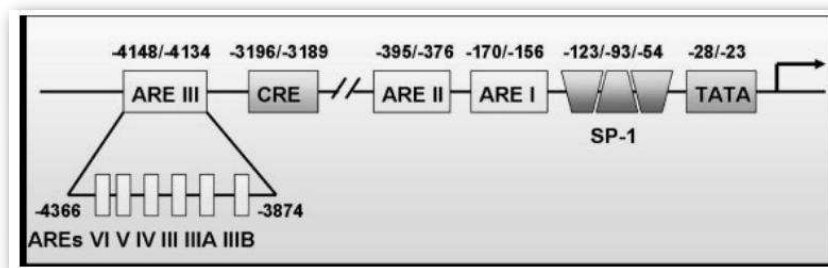
**Figura 5.** Esquema de la vía de señalización del AR. (Figura adaptada de Matsumoto y colaboradores (Matsumoto *et al.* 2013))

#### I.4 El antígeno prostático específico (PSA)

El PSA, también conocido como calicreína K3 (KLK3), es una serin-proteasa de 33KDa, cuya síntesis es regulada por andrógenos, y que posee una actividad enzimática similar a la de la quimotripsina. En la próstata normal el PSA es secretado hacia los ductos prostáticos para formar parte del semen eyaculado, donde su función es clivar las proteínas semenogelina I y II permitiendo así la licuefacción del semen y la liberación de los espermatozoides del coágulo seminal.

### Regulación por andrógenos del gen del PSA

El gen del PSA, está muy bien caracterizado, es un gen blanco específico del AR y por ello es utilizado comúnmente como modelo para estudiar la señalización por andrógenos en células epiteliales prostáticas. Cuando el AR se activa por su unión a testosterona, se une a los sitios ARE en el gen del PSA, promoviendo su transcripción. Actualmente se conocen tres sitios ARE para KLK3 (Fig. 6). El promotor proximal está formado por AREI y AREII. AREI está localizado entre -170 y -156 pb del sitio de inicio de la transcripción y tiene alta afinidad por el AR (Kim J. y Coetzee 2004). El AREII se localiza a -400 pb del punto de inicio de la transcripción, éste es un sitio que une al AR con menor afinidad que el anterior pero que coopera con el AREI; ambos son suficientes para obtener moderados niveles de expresión génica regulada por andrógenos. El tercer sitio, el AREIII, se encuentra a -4134 pb y forma parte de un enhancer distal localizado desde -3738 pb hasta -5824 pb, que contiene cinco sitios ARE débiles. El AREIII es específico de la próstata, a diferencia de los sitios AREI y II que también promueven la transcripción en células no prostáticas (Lawrence et al. 2012) (Fig. 6).



**Figura 6.** Esquema del promotor del gen del PSA. (Figura adaptada de Kim y Coetzee (Kim J. y Coetzee 2004))

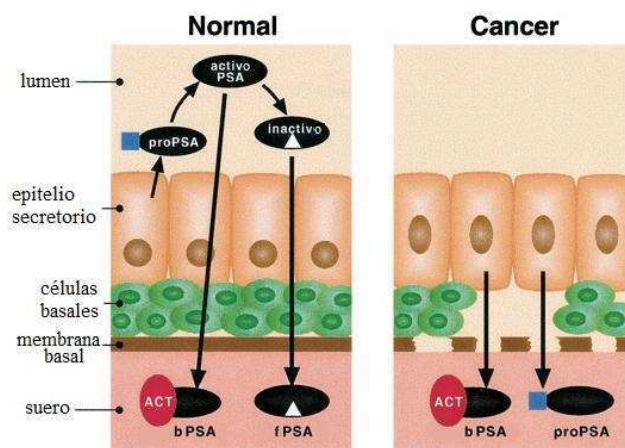
### PSA y Diagnóstico del PCa

El PSA es producido por las células epiteliales lumbinales de la próstata y debido a que es una proteasa se almacena en los ductos prostáticos como una pro-enzima, que debe clivarse para su activación. Luego se secreta dentro de los ductos glandulares y solo entra en el suero por filtraciones del fluido extracelular de la glándula, donde el PSA activo rápidamente es complejoado con proteínas inhibidoras de proteasas (principalmente alfa1 anti-quimotripsina o ACT), conocido como PSA unido o bPSA. También se encuentran en circulación las formas inactivas del PSA, producto del clivaje en sitios incorrectos, que no forman complejos con los



inhibidores de proteasas u otras proteínas y circulan como PSA libre o fPSA (Balk et al. 2003).

Durante la tumorigénesis la glándula pierde su arquitectura y puede ocurrir una disrupción de la membrana basal del órgano. Esto ocasiona que el fluido contenido en el lumen de la próstata alcance la circulación sanguínea y es así como durante el cáncer se elevan los niveles en sangre del PSA, lo cual permite utilizarlo como una herramienta en el diagnóstico del PCa (Fig. 7). Los clivajes internos ocurren en el plasma seminal y están presentes a niveles más bajos en el tejido prostático tumoral, presumiblemente debido a la interrupción de la secreción normal del PSA en los ductos. Consecuentemente la relación de PSAf/PSAtotal, denominado índice de PSA, es más baja en muchos pacientes con cáncer y es útil para discriminar entre tejido normal y tumoral. El Pro-PSA y varias formas truncas del mismo también pueden detectarse en suero (Peltola et al. 2011; Zhang M. Z. y Lu 2012)



**Figura 7.** Esquema de la liberación del PSA a la sangre. (Figura adaptada de Balk y colaboradores (Balk et al. 2003))

Actualmente la metodología para el diagnóstico temprano del PCa se basa tanto en la cuantificación de los niveles de esta proteasa como en el examen rectal digital (DRE); sin embargo, la utilidad del PSA en el diagnóstico del PCa es objeto de mucho debate. Esto se debe a la baja especificidad del marcador ya que un elevado nivel del mismo puede ocurrir también como consecuencia de retención urinaria, prostatitis e HPB y así la decisión se torna perjudicial para el paciente que sufre una biopsia innecesaria con posibles desventajas como son sangrado e infección. (Zhang J. et al. 2012. Por ello se ha tratado de incrementar la eficiencia del método midiendo diferentes variantes del PSA, por ejemplo el PSAf {Kayikci, 2012 #2011) o midiendo sus variantes de clivaje (Tosoian y Loeb 2010).

En base a esta problemática diferentes instituciones como la American Urological Association (AUA), la European Association of Urology (EAU) y la European Society for Medical Oncology establecen Guías a seguir para la utilización del PSA en el diagnóstico y seguimiento del PCa (Van der Meer et al. 2012).

Actualmente se está cambiando el paradigma de la investigación en el diagnóstico, no solo centrándose en la detección temprana de la enfermedad, sino también en la posibilidad de encontrar nuevos marcadores moleculares para identificar aquellos cánceres que progresarán hacia tipos agresivos de los que no tendrán relevancia clínica (Dijkstra et al. 2012).

### **I.5 Etiología y desarrollo del PCa**

El PCa es una enfermedad multifactorial, podemos establecer una organización de los factores predisponentes basándonos en aquellos que son ambientales y aquellos no modificables. Entre los primeros encontramos el consumo de grasa animal, alcohol, tabaco, obesidad, drogas anti-inflamatorias no esteroides, vitaminas y minerales (calcio, selenio y zinc) (Kral et al. 2011), mientras que los segundos, corresponden a la edad, raza e historia familiar o predisponentes genéticos (Crawford 2003; Kral et al. 2011; Leitzmann y Rohrmann 2012). La edad es un factor fuertemente asociado al PCa, el envejecimiento incrementa en forma progresiva las probabilidades de contraerlo (Crawford 2003). Por otro lado este tipo de cáncer tiene una patogénesis multifocal (Andreoiu y Cheng 2010), a pesar de que marcadores moleculares sugieren un origen monoclonal (Mehra et al. 2008; Liu W. et al. 2009). En base a estas dos observaciones diversos autores proponen que la heterogeneidad de los tumores puede deberse a subsecuentes transformaciones neoplásicas de clones que van teniendo ventaja selectiva (Shen y Abate-Shen 2010; Boyd et al. 2012).

#### Grado de Gleason del PCa

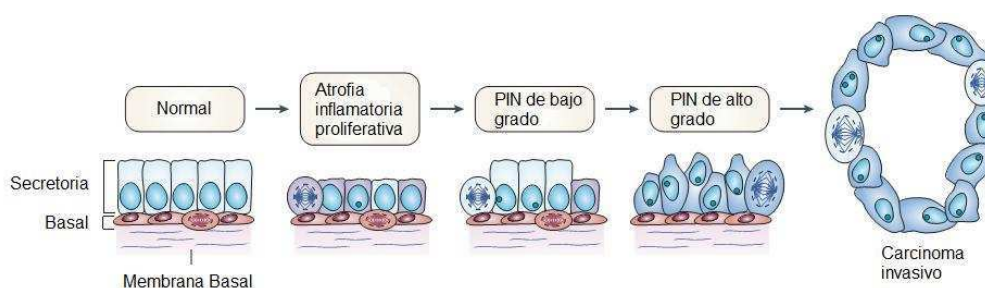
Debido a su variación interna los carcinomas de próstata se clasifican en distinto grado según sus características histológicas, lo que se denomina grado de Gleason. Este sistema clasifica microscópicamente a las células desde bien diferenciadas (grado 1) hasta muy indiferenciadas (grado 5). Para la clasificación se establecen, mediante observación microscópica del tejido, los dos patrones estructurales (primario y secundario) de mayor área y se le asigna a cada uno un grado de 1 a 5, ambos grados son sumados, alcanzando un valor mínimo de 2 puntos y un máximo de 10 puntos y se reporta como el grado de Gleason del

tumor (Gleason 1966). El grado 4 corresponde a cáncer. Para su evaluación clara, se debe reportar como la suma de los dos patrones, por ejemplo 7 (3+ 4).

### Relación entre la atrofia inflamatoria proliferativa y el PCa

Histopatológicamente se sabe que el PCa puede originarse a partir de un tipo de lesión prostática con origen inflamatorio, llamada atrofia inflamatoria proliferativa (PIA), que difiere de enfermedades benignas de la próstata como la prostatitis y la HPB. La prostatitis consiste en la inflamación de la glándula y ocurre entre un 10% a un 15% de los hombres (Sharp et al. 2010). Las causas de esta patología pueden ser de origen bacteriano, como consecuencia de infecciones urinarias o de transmisión sexual, o no bacteriano, donde el agente etiológico es más difícil de identificar, pero podría originarse como consecuencia del trauma físico. La HPB consiste en el agrandamiento de la glándula por la formación de nódulos, con una mezcla de tejido glandular y estromal, que poseen un origen multifactorial incluyendo causas ambientales y genéticas (Harik y O'Toole 2012).

La lesión PIA, a diferencia de las anteriormente nombradas, es una lesión atrófica localizada, con infiltrado inflamatorio, que tiene la capacidad de proliferar. Se la ha considerado precursora de otra lesión llamada neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (De Marzo et al. 1998; Sampson et al. 2007; De Nunzio et al. 2011), la cual se caracteriza por la proliferación epitelial, con cambios citológicos que mimetizan al cáncer, incluyendo agrandamiento nuclear (Fig. 8). A diferencia del adenocarcinoma in situ posee una membrana basal que ocasionalmente presenta disrupciones (Zynger y Yang 2009). Actualmente se sabe que el PIN de alto grado (HGPIIN), el PIN que tiene mayores modificaciones citológicas, es una lesión potencialmente precursora del PCa, ya que comparte marcadores genéticos y fenotípicos, que sumado a caracteres moleculares podría tener un valor diagnóstico para biopsias que en una primera toma de muestras no son positivas para PCa (Bostwick y Cheng 2012; Klink et al. 2012).

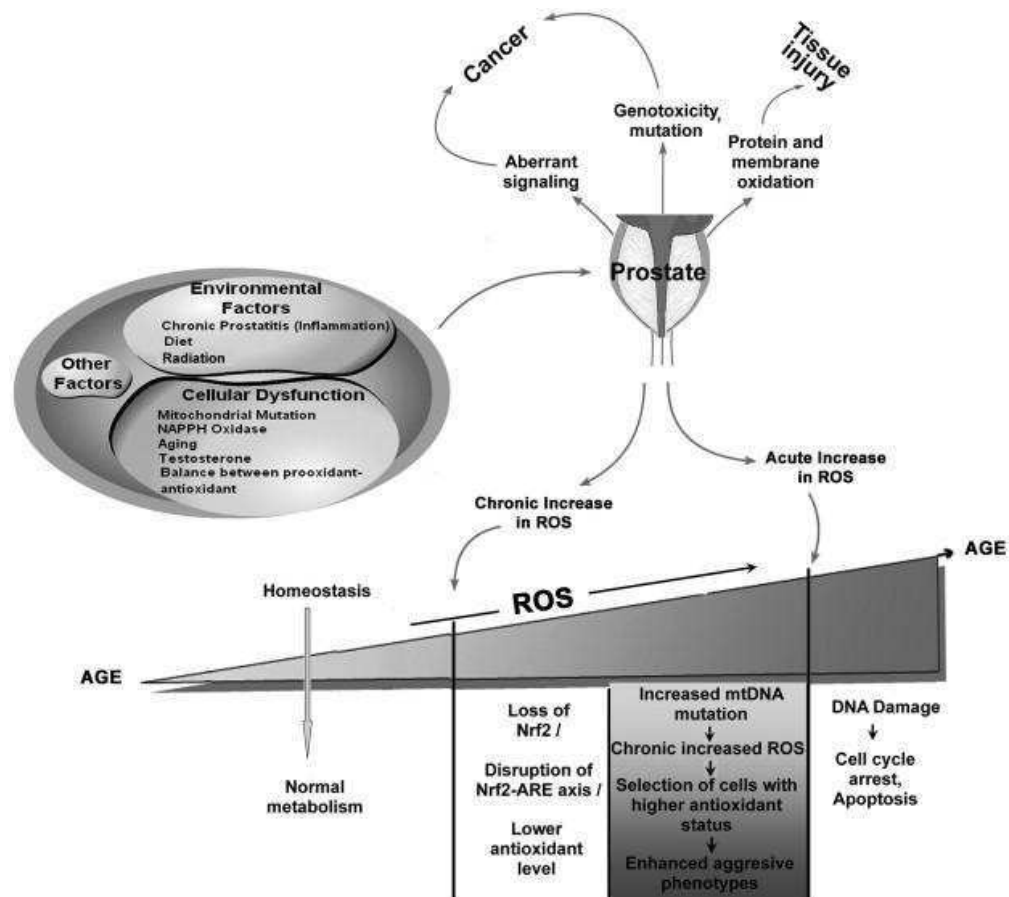


**Figura 8.** Esquema de la progresión neoplásica temprana en la próstata. (Figura adaptada de De Marzo y colaboradores (De Marzo et al. 2007)).

### Procesos que promueven el PCa

Existen múltiples procesos asociados al desarrollo del PCa. Uno de ellos es la inflamación crónica. Las citoquinas y mediadores inflamatorios podrían alterar la transducción de señales en las células de próstata. Además el exceso de los radicales oxidativos generados por las células inflamatorias no podrían neutralizarse, lo cual sumado a la regeneración proliferativa causada por la injuria del infiltrado inflamatorio, facilitaría el desarrollo del PCa (De Marzo et al. 2007; Sciarra et al. 2008). Apoyando esta hipótesis De marzo propone que tanto la inflamación crónica como la PIA ocurren principalmente en la zona periférica de la próstata (De Marzo et al. 2007); adicionalmente mutaciones en varios genes que codifican componentes del sistema inmune y vías inflamatorias fueron asociadas al riesgo de desarrollar PCa (Kazma et al. 2012).

Otro proceso que podría promover el PCa es el estrés oxidativo y el consecuente daño en el ADN (Khandrika et al. 2009) (Fig. 9). Este estrés es consecuencia de un desbalance entre las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las enzimas detoxificantes presentes en la célula. En el PCa está ampliamente reportada la disminución de las defensas anti-oxidantes, a diferencia de la HPB (Hamid et al. 2011). Particularmente interesante son los hallazgos de Ouyang y colaboradores (Ouyang et al. 2005) que sugieren que la pérdida de Nkx3.1, mutación muy frecuente en el PCa, conlleva a la reducción de varias enzimas anti-oxidantes y esto se manifiesta en un aumento de los niveles de la base del ADN oxidada 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (Ouyang et al. 2005). Todo este desbalance de los niveles de ROS tiene adicionalmente el efecto de modificar varias vías de señalización celular reguladas por el estado redox (Kumar B. et al. 2008; Thapa y Ghosh 2012), alterando procesos biológicos críticos en la malignidad como la proliferación, la motilidad y la supervivencia y promoviendo así el disparo de la carcinogénesis.



**Figura 9.** Mecanismo de la producción de ROS y la respuesta celular de la próstata.

Factores intrínsecos y extrínsecos conducen al aumento de ROS en la glándula prostática. Los niveles incrementados de ROS pueden llevar a la disfunción celular y a la producción de niveles aún mayores de oxidantes. Estos elevados niveles alteran la próstata y disminuyen las defensas antioxidantes (disruptiendo el eje ARE-Nrf2), lo cual asociado al incremento en las mutaciones en el ADNmt conduce a fenotipos agresivos y causa daño en el ADN. ARE: elementos de respuesta anti-oxidantes. Nrf2: factor nuclear eritroide 2 (Figura adaptada de Khandrika y colaboradores (Khandrika *et al.* 2009)).

Otro evento que ha sido implicado en la iniciación del PCa es el acortamiento de los telómeros. En el PCa y en el HGPIN la enzima telomerasa está activa, a diferencia de lo que ocurre en la HPB. Sin embargo, aún no se conoce como este evento contribuye a la iniciación de la carcinogénesis (Shen y Abate-Shen 2010).

Recientemente se ha involucrado al fenómeno de senescencia como un posible mecanismo supresor de tumores (Nardella *et al.* 2011), que actuaría deteniendo a las células alteradas en un estado quiescente y consecuentemente a su pérdida como un posible factor iniciador del PCa (Narita y Lowe 2005). Esto es apoyado por la expresión de marcadores de senescencia como  $p16^{\text{ink4a}}$  y  $p14^{\text{arf}}$ , cuyos niveles aumentan con la edad y particularmente en

cánceres no malignos, lo cual podría ayudar a discernir entre los PCa indolentes de las formas más agresivas (Coppe et al. 2011; Burd et al. 2013).

### Alteraciones moleculares en el PCa

Conjuntamente con estos procesos previamente mencionados existen múltiples alteraciones moleculares en el PCa que pueden constituir agentes iniciadores o promotores del cáncer. Se han encontrado en el PCa mutaciones somáticas como rearrreglos cromosómicos frecuentes y genes con alteración en el número de copias. Por ejemplo, la translocación TMPRSS2: ETS, da como resultado la fusión de la serín-proteasa transmembrana 2 con la secuencia codificante del virus de la eritroblastosis E26 (ETS), resultando en un oncogen regulado por un promotor respondedor a andrógenos (Tomlins et al. 2006; Saramaki et al. 2008; St John et al. 2012) así como también en la alteración de ETS que podría favorecer la transición epitelio mesénquima (Klezovitch et al. 2008). Del mismo modo la delección en el fragmento cromosómico 8p21.2 es uno de los mecanismos propuestos de la disminución en la expresión de Nkx3.1 (Song et al. 2009). Esta proteína tiene una importante función en la diferenciación del epitelio prostático y su pérdida parece ser un evento temprano en el desarrollo del PCa (Kim M. J. et al. 2002; Abate-Shen et al. 2008). También es frecuente la amplificación del segmento cromosómico 8q24 cercana al oncogen Myc el cual está sobre-expresado en estos tumores (Sato et al. 1999). Recientemente se descubrió que muchos genes supresores de tumores se ven frecuentemente afectados por los rearrreglos cromosómicos (Mao et al. 2011). Por ejemplo un caso de alteraciones en el número de copias se encuentra en la delección de PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina), el cual es un regulador negativo de la vía de supervivencia de la quinasa Akt y su pérdida está asociada a un mal pronóstico en pacientes con PCa (Antonarakis et al. 2012; Choucair et al. 2012). Múltiples cambios epigenéticos son frecuentes en el PCa y llevan a la alteración de genes implicados en la progresión del cáncer (Chin et al. 2011). Se incluyen dentro de las modulaciones epigenéticas los cambios en la expresión de los miRNAs. En el PCa se ha asociado la disminución de ciertos miRNA con la adquisición de características malignas como resistencia a la castración, aumento de la invasión y de la proliferación (Ishteiwy et al. 2012; Puhr et al. 2012).

Asimismo en este subgrupo de alteraciones moleculares se pueden agrupar las diversas mutaciones que alteran las vías de señalización en las células de cáncer contribuyendo a la progresión del mismo. Entre estas vías podemos incluir a la vía de Akt, de mTOR (mammalian target of rapamycin), de MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), y a diversas vías que están involucradas en inflamación como la de NFκB (factor nuclear potenciador de

las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y otras (Zhang L. et al. 2009; Mukherjee et al. 2011; Walker et al. 2013).

### Evolución del PCa

La progresión del PCa puede definirse en etapas sucesivas en las que actualmente se han identificado varios de los procesos y alteraciones génicas involucradas (Fig. 10):

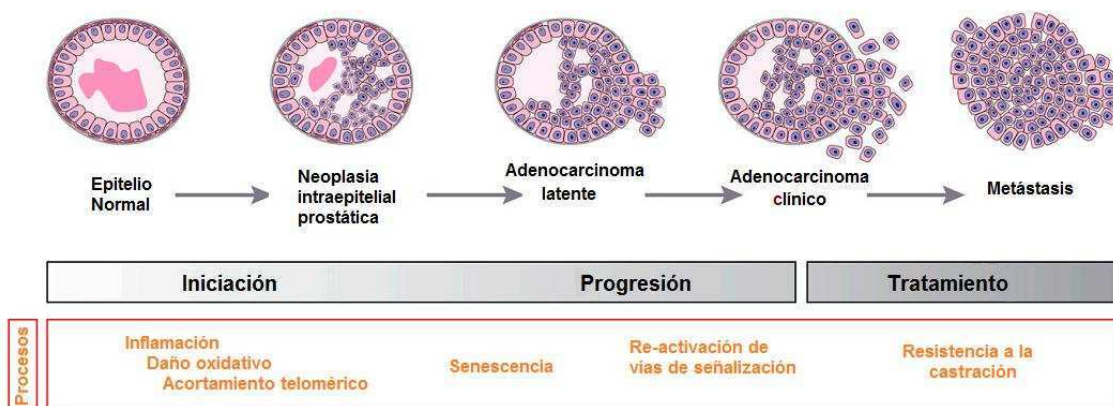
1) **enfermedad localizada**, en la cual el cáncer está confinado dentro de la cápsula de la próstata y no se ha dispersado hacia otras partes del cuerpo. El PCa primario es dependiente de andrógenos para crecer y sobrevivir.

Entre las fases 1 y 2 surge la enfermedad recurrente donde, después de la terapia localizada, hay signos, típicamente un aumento del PSA, indicando que el cáncer ha reincidido.

2) **enfermedad metastásica**, en esta etapa el PCa está creciendo fuera de la próstata, en las áreas que la rodean.

3) **enfermedad refractaria a hormonas**, el PCa continúa creciendo a pesar del tratamiento con drogas que producen la ablación de las hormonas masculinas (andrógenos/testosterona necesarias para el crecimiento de las células de la próstata) y que frecuentemente se emplean en combinación con antagonistas competitivos del AR.

La cirugía radical del PCa en el estadio avanzado es raramente curativa. La radiación también resulta inefectiva y es solo paliativa, y la quimioterapia no representa un pronóstico de supervivencia muy prolongada en la mayoría de los protocolos de uso habitual. En este estadio la supervivencia es de entre 12 y 18 meses.



**Figura 10.** Esquema de la progresión del PCa. Estadios de la progresión del PCa junto a los procesos moleculares involucrados en cada estadio. (Figura adaptada de Shen y colaboradores (Shen y Abate-Shen 2010)).

No todos los hombres con PCa progresarán a través de estas fases. De hecho, el PCa puede permanecer confinado dentro de la glándula indefinidamente y nunca crecer suficientemente rápido para convertirse en un problema en el tiempo de vida del individuo. Es por este motivo que actualmente hay una búsqueda intensiva de nuevos marcadores que permitan identificar un cáncer agresivo de uno indolente que no requiere tratamiento (Barbieri et al. 2012; Dijkstra et al. 2012).

### **I.6 Mecanismos involucrados en la independencia de andrógenos del PCa**

Aproximadamente del 10 al 20% de los pacientes con PCa ya presentan enfermedad metastásica al momento del diagnóstico, mientras que entre el 20 y el 30% de los pacientes diagnosticados con enfermedad localizada posteriormente desarrollarán metástasis (Felici et al. 2012). Para estos pacientes la terapia de elección es la ablación hormonal, la cual lleva a una regresión del tumor y de las metástasis (demostrando la importancia de la señalización de andrógenos en las células tumorales). Sin embargo, en la mayoría de los pacientes el cáncer reincide como un tumor resistente a la castración en un período de entre 12 y 18 meses (Narayanan et al. 2010). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la expresión del AR está presente en el 80% de las lesiones metastásicas, sugiriendo que continúa siendo funcional, aún en ausencia de andrógenos. Es por ello que los términos PCa independiente de andrógenos o refractario a hormonas se han dejado de lado y se emplea el término PCa resistente a la castración (CRPC).

Esta actividad del AR a muy bajas concentraciones o en ausencia de andrógenos circulantes, que ocurre durante la resistencia a la castración en las células tumorales es el resultado de la participación de uno o varios de los siguientes mecanismos:

**Amplificación de la expresión del AR** (Chen C. D. et al. 2004; Attar et al. 2009).

**Mutaciones del AR que llevan a la independencia de andrógenos o activación por otros ligandos** (Brooke et al. 2008); (Zhou et al. 2008; Steinkamp et al. 2009).

**Variantes no-canónicas de splicing del AR** (Guo Z. et al. 2009; Dehm y Tindall 2011).

**Alteración en la expresión o actividad de las proteínas co-reguladoras** (Agoulnik y Weigel 2009; Golias et al. 2009).

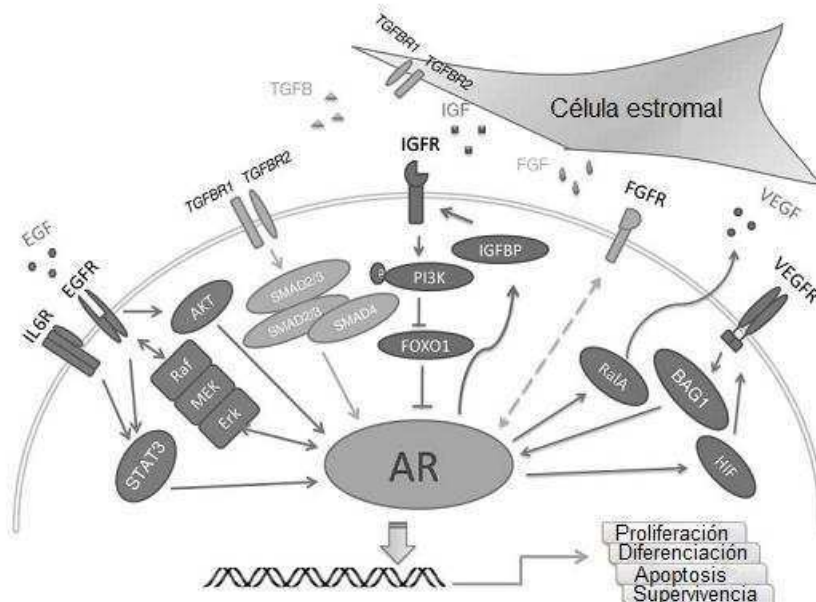
**Producción intracrina de andrógenos** (Dillard et al. 2008).



## Señalización cruzada con otras vías (factores de transcripción) (Zhu y Kyprianou 2008)

En el CRPC ocurre una alteración en las vías de señalización fisiológicas generalmente involucradas en la proliferación y la supervivencia que se activan constitutivamente favoreciendo a la carcinogénesis y que presentan una interacción cruzada con la señalización por el AR, aumentando su actividad o la de sus co-activadores. Entre estas vías las más descritas son la de IGF (Aggarwal R. R. et al. 2011), STAT3 (factor transductor de señal y activador de la transcripción 3) (Blando et al. 2011), EGF (Traish y Morgentaler 2009), Wnt (del inglés Int (integration) y Wg (wingless)) (Schweizer et al. 2008), NFκB (Jin et al. 2008; Zhang L. et al. 2009) FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) (Memarzadeh et al. 2007), VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) (Rinaldo et al. 2007), TGFβ (Zhu et al. 2008) (Fig. 11).

Como resultado de todas estas alteraciones y dado que no existe un tratamiento adecuado para la etapa metastásica de la enfermedad, la clave para lograr una mejor aproximación terapéutica está en la comprensión del o de los mecanismos predominantes para favorecer la progresión de un determinado tumor.



**Figura 11.** Esquema de la interacción entre las vías de señalización en el PCa. Los factores de crecimiento IGF, FGF, VEGF, EGF y TGFβ y las citoquinas son secretados por las células estromales activadas. En las células epiteliales prostáticas cancerosas interactúan con la vía del AR, a su vez estas células secretan VEGF y TGFβ los cuales afectan al microambiente tumoral y estimulan la proliferación de las células en el estroma. (Figura adaptada de Zhu y colaboradores (Zhu y Kyprianou 2008)).

## I.7 La inflamación y el PCa

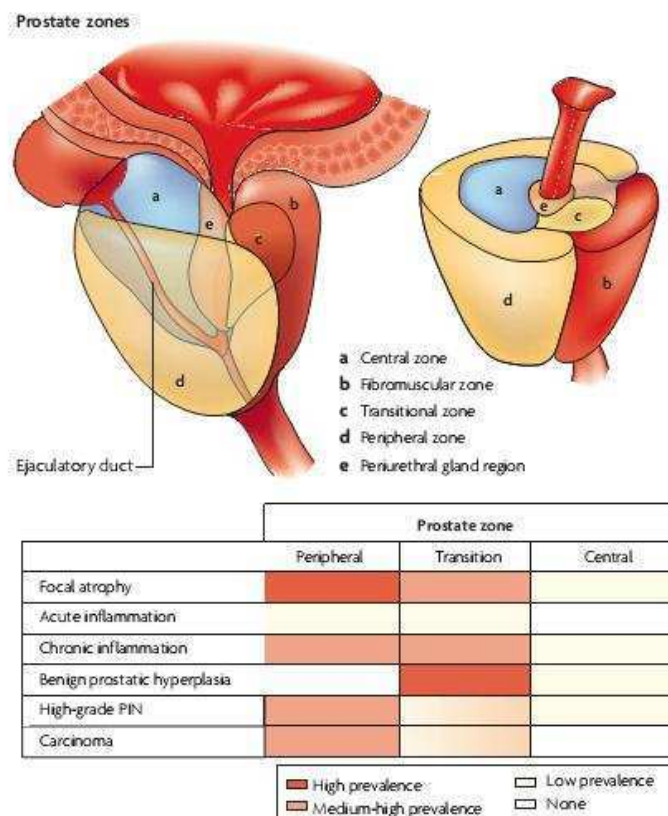
### Inflamación y cáncer

Para muchos tipos de cáncer es ampliamente aceptado el rol etiológico que posee la inflamación provocada por agentes infecciosos, por ejemplo en el cáncer de cérvix (por HPV), en el gástrico (por *H. pilory*) y en el cáncer hepatocelular (por el virus de la hepatitis A o C). Datos estadísticos reportan que el 16% del cáncer a nivel mundial es atribuible a agentes infecciosos (de Martel et al. 2012).

La inflamación fue inicialmente vinculada al cáncer a través de la observación de Virchow en 1863, de que muchos tejidos neoplásicos tenían un infiltrado inflamatorio. En estos últimos años se profundizó el estudio respecto a cómo el microambiente producido por un proceso inflamatorio crónico puede contribuir a la adquisición de características distintivas del cáncer (“hallmarks”), abasteciendo de moléculas bio-activas al microambiente tumoral que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis (Hanahan y Weinberg 2011). Adicionalmente la inflamación también contribuye a las modificaciones genéticas que promueven la tumorigénesis. Las células inflamatorias liberan ROS que son mutagénicos acelerando así la evolución genética hacia un fenotipo más maligno (Aggarwal B. B. et al. 2006; Aivaliotis et al. 2012).

### Rol de la inflamación en el Pca

La relación entre el PCa y la inflamación proviene principalmente de la evidencia del rol de las lesiones inflamatorias prostáticas como precursoras del carcinoma, como es el caso del HGPIN y la PIA. Ambas lesiones ocurren en la misma zona de la próstata que el PCa (De Marzo et al. 2007) y adicionalmente estudios morfológicos han demostrado transiciones frecuentes entre áreas de PIA con HGPIN (De Marzo et al. 1999; Putzi y De Marzo 2000) así como también entre el lesiones atróficas con el adenocarcinoma (Wang W. et al. 2009) (Fig. 12). En muchos casos se ha observado que estas lesiones comparten con el PCa alteraciones en vías de señalización claves; por ejemplo las alteraciones en la expresión de genes supresores tumorales como *Nkx3.1* (Bethel et al. 2006) y *CDKN1B* que codifica para  $p27^{Kip1}$  (De Marzo et al. 1999; van Leenders G. J. y Schalken 2003), que están reprimidos en las lesiones atróficas focales y en el PCa mientras que están altamente expresados en el epitelio prostático normal.



**Figura 12.** Predisposición al PCa según la zona glandular.

La mayoría de las lesiones cancerosas ocurren en la zona periférica de la glándula, algunas ocurren en la zona de transición y casi ninguna ocurre en la zona central. La mayoría de las HPB se desarrollan en la zona de transición y pueden aumentar su tamaño considerablemente. La inflamación en la zona periférica ocurre en asociación con la atrofia en la mayoría de los casos. Los carcinomas en la zona periférica se encuentran frecuentemente en asociación con el PIN de alto grado, mientras que el carcinoma en la zona de transición tiende a ser de menor grado y está más frecuentemente asociado con hiperplasias adenomatosas atípicas o adenosis. (Esquema adaptado de De marzo y colaboradores (De Marzo *et al.* 2007))

La inflamación prostática que se genera como consecuencia del reflujo urinario, de la infección bacteriana o viral, de factores dietarios y hormonales genera una gran diversidad de mediadores inflamatorios que juegan un importante rol en promover la proliferación, la supervivencia y la angiogénesis de las células tumorales. Este microambiente tumoral involucra células del músculo liso, del endotelio, inflamatorias, fibroblastos y componentes de la matriz extracelular (ECM). Los mediadores producidos por ellas, participan en procesos como la remodelación de la ECM, el reclutamiento de más células inflamatorias y median la inducción de citoquinas y factores de crecimiento que pueden promover el PCa. (Gueron *et al.* 2012).

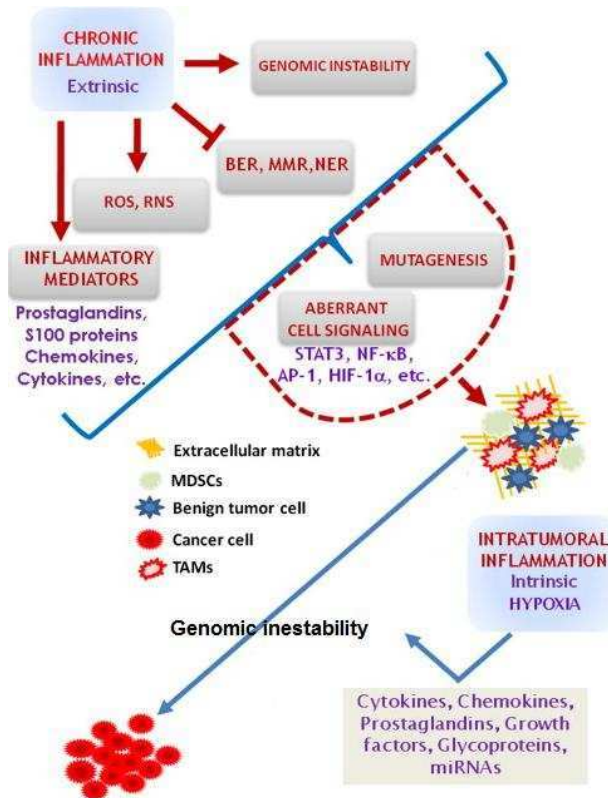
En el PCa las células del estroma producen numerosas citoquinas (Chung *et al.* 2006), como IL-6 e IL-8 que se han encontrado aumentadas respecto a la próstata normal (Konig *et al.* 2004; Mechergui *et al.* 2009). Además, previamente se determinó que la IL-8 está sobre-

expresada en el suero de pacientes con PCa metastásico (McCarron et al. 2002). Esta citoquina tiene en estos tumores un rol como quimioattractante y se ha demostrado su participación en la progresión a la independencia de andrógenos (Araki et al. 2007). También se observó que IL-4 e IL-6 promueven la activación del AR (Chen T. et al. 2000; Lee S. O. et al. 2009b).

Particularmente IL-6 se ha visto involucrada en la activación del AR a través de múltiples vías de señalización (Yang L. et al. 2003). Esta capacidad de IL-6 para activar las vías de MAPK (quinasas asociadas a mitógenos), PI3K/Akt (fosfoinosítol-3 quinasa/ Akt) y STAT3, las cuales son importantes en la supervivencia y en la proliferación celular, ha convertido a IL-6 en un importante blanco de las terapias actuales (Guo Y. et al. 2012). Recientemente se ha propuesto que IL-6 podría aumentar la expresión de VEGF y de uPA (activador del plasminógeno tipo urokinasa) en el PCa (Weiss et al. 2011) y esto puede promover la metástasis favoreciendo la angiogénesis mediada por VEGF y la degradación de la ECM por uPA.

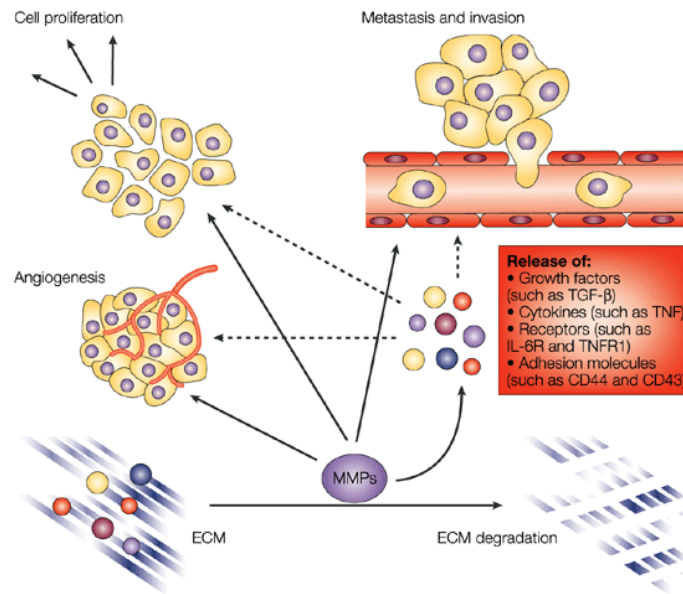
Tanto las citoquinas previamente mencionadas, como otros factores liberados por las células del microambiente inflamatorio tumoral, conducen a la activación de factores de transcripción como NFκB, AP-1 (proteína activadora1) y STAT3, los cuales también se han visto constitutivamente activados en el PCa, sugiriendo su importancia clave en la transformación maligna (He B. et al. 2003; Colotta et al. 2009; Rebouissou et al. 2009).

Muchas de las alteraciones que promueven inicialmente al cáncer consisten en alteraciones en oncogenes que confieren a las células la capacidad de proliferar descontroladamente. Actualmente se propone que el mecanismo por el cual se acumulan estas mutaciones está relacionado a la inestabilidad genética causada por la inflamación (Pathak et al. 2005; Mantovani 2009; Kundu y Surh 2012) (Fig. 13).



**Figura 13.** Dos paradigmas que unen la inflamación y el cáncer. La inflamación crónica (extrínseca) es acompañada por la producción de ROS, lo cual causa daño en el ADN e inestabilidad genómica, iniciando la carcinogénesis. Adicionalmente la producción excesiva de mediadores inflamatorios altera vías de señalización y lleva a la inducción de genes promotores del crecimiento. Por otro lado el estado inflamatorio intra-tumoral (intrínseco), creado por la interacción entre citoquinas y factores de crecimiento liberados por el tumor o el estroma incrementa la angiogénesis, metástasis y promueve el escape tumoral. (Esquema adaptado de Kundu (Kundu y Surh 2012)).

Finalmente la inflamación contribuye con el remodelado de la ECM. Existen numerosas proteasas que pueden ser liberadas por las células tumorales o por las células estromales, principalmente por los macrófagos asociados al tumor (TAMs), en respuesta a la inflamación (Quax et al. 1997; Lin E. Y. y Pollard 2004). Entre ellas las que se asocian frecuentemente al PCa son las metaloproteasas (MMP) 9 y 2 y el sistema uPA/uPAR (Cardillo et al. 2006) (Pakneshan et al. 2003). Estas proteasas poseen varios roles en la tumorigénesis y la malignidad (Zou et al. 2012) (Xu et al. 2010). Ellas degradan la membrana basal y la ECM permitiendo la diseminación de células tumorales que van a dar origen a las metástasis. Se propuso que juegan un rol principal en la liberación de los factores de crecimiento desde la matriz, que promueven la proliferación y la supervivencia de las células tumorales (Kong et al. 2007; Sung et al. 2007) (Fig. 14).



**Figura 14.** Invasión y proteasas. Las MMP favorecen el crecimiento del tumor al clivar de las membranas celulares precursores de factores de crecimiento como el TGF $\beta$ . Adicionalmente liberan por degradación de la ECM factores de crecimiento y factores pro-angiogénicos embebidos en ella. Las MMPs también regulan la invasión al degradar la ECM. (Esquema adaptado de Rao (Rao 2003)).

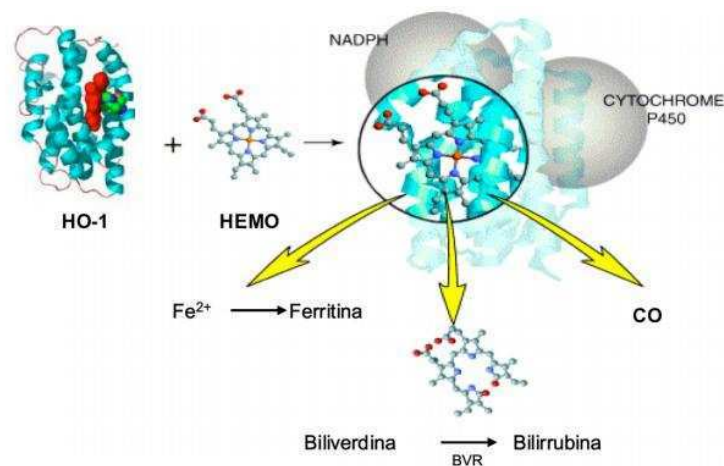
En síntesis, varios factores y vías de señalización convergen en el desarrollo y la progresión del PCa modificando la expresión génica de la célula tumoral y el microambiente que la circunda. En este trabajo de tesis aportaremos nuevas evidencias para esclarecer el rol de la inflamación en el encendido de vías de señalización críticas en la carcinogénesis prostática.

## II. HO-1

### II.1 Generalidades

La hemo oxigenasa (HO) (EC 1.14.99.3), originalmente descrita como una proteína de membrana microsomal, cataliza el primer paso limitante en la degradación oxidativa del hemo para producir monóxido de carbono (CO), biliverdina IX $\alpha$ , la cual es reducida rápidamente a bilirrubina por la biliverdina reductasa, y hierro ferroso (Tenhunen et al. 1969). El CO endógeno producido actúa como segundo mensajero afectando a varias funciones celulares incluyendo la inflamación, la proliferación y la apoptosis. La bilirrubina tiene potente actividad anti-oxidante y el hierro ferroso rápidamente induce la expresión de ferritina, la cual secuestra al hierro libre (Otterbein et al. 2003) (Fig. 15).

Hasta el momento se conocen tres isoformas de esta enzima, HO-1, HO-2 y HO-3 derivadas de diferentes genes (McCoubrey et al. 1997; Ryter y Choi 2002) y con distinta regulación de su expresión. HO-1 se expresa en baja cantidad en todos los tejidos excepto el bazo donde sus niveles son abundantes (Maines y Gibbs 2005) y se induce rápidamente en respuesta a diversos estímulos constituyendo un importante agente citoprotector y antioxidante (Abraham y Kappas 2008; Morse et al. 2009). La isoforma 2 se expresa en forma constitutiva y en altas concentraciones en cerebro y testículos. La isoforma 3, que es estructuralmente similar a la HO-2 con la cual comparte un 90% de homología, fue detectada únicamente en cerebro de rata. Se ha sugerido que podría tener un rol regulatorio en procesos que son dependientes del hemo (McCoubrey et al. 1997; Hayashi et al. 2004).



**Figura 15.** Los productos de la reacción enzimática catalizada por HO-1 son el hierro libre, la biliverdina y el CO (Esquema adaptado de Otterbein y colaboradores (Otterbein *et al.* 2003)).

### HO-1 y su localización

Históricamente HO-1 se caracterizó por su localización en el retículo endoplasmático liso (REL) como una proteína integral de membrana (Tenhunen et al. 1969), anclada al REL a través de una región transmembrana simple en su extremo C-terminal (Kim H. P. et al. 2004). Actualmente se propone que podría ser clivada en su segmento transmembrana (Huber Iii et al. 2009). En cuanto a la compartimentalización celular se ha descrito su localización subcelular en diversas organelas y se han propuesto diferentes funciones para esta redistribución (Was et al. 2010; Kim H. P. et al. 2011) (Fig. 16).

Se la ha encontrado asociada a la membrana plasmática, en caveolas por medio de su asociación con las proteínas caveolinas-1 y 2 en células mesangiales glomerulares y en células endoteliales, y es notable que este proceso es regulado por varios agentes (Patel y Insel 2009). Se observó una localización perinuclear de HO-1 en células del endotelio microvascular de

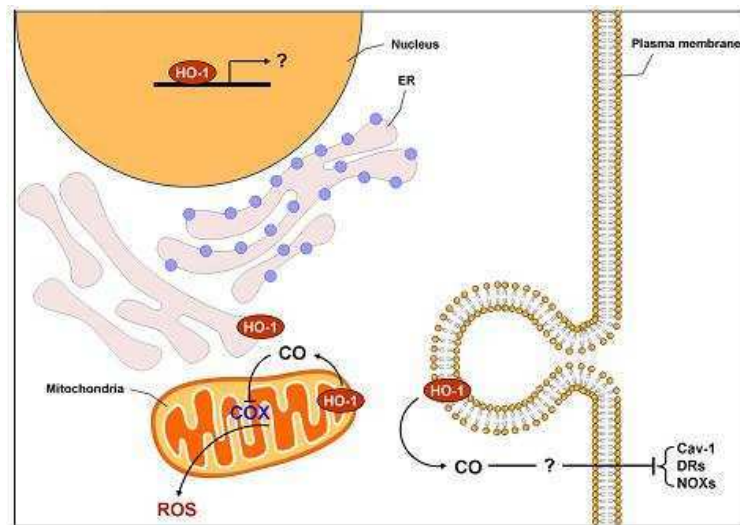
cerebro de ratas recién nacidas y en cerebros humanos con enfermedades neurodegenerativas (Ewing y Maines 2006). En células epiteliales de pulmón de ratas Slebos y colaboradores (Slebos et al. 2007) observaron que HO-1 se localizaba en la mitocondria frente al estrés y que protegía a las células en estas condiciones. Del mismo modo se demostró que esta proteína se transloca a la mitocondria, donde ejerce protección de la injuria producida por los ROS mitocondriales en células gástricas (Bindu et al. 2011) y hepáticas (Converso et al. 2006).

Finalmente se ha demostrado la localización nuclear de HO-1 en varios tejidos, aunque no se han identificado en su estructura señales de localización nuclear. Sin embargo, se sabe que proteínas menores a 50 KDa pueden moverse por difusión entre ambos compartimientos celulares. En células de pulmón de fetos de rata (RFL-6), transfectadas con la secuencia completa del cDNA de HO-1 y expuestas a hiperoxia, se observó la localización perinuclear de esta proteína, seguida por la migración hacia el núcleo. Además, un hallazgo interesante para resaltar es que cuando el nivel de la actividad de HO-1 era bajo, la proteína estaba localizada en el núcleo pero aún había aumento de la supervivencia celular bajo hiperoxia (Suttner et al. 1999). Giordano y colaboradores (Giordano et al. 2000) detectaron un aumento en el número de núcleos con tinción positiva para HO-1 en el tejido adiposo marrón de ratas expuestas a estrés térmico, y señalaron que los productos secundarios de HO-1 fueron capaces de modular genes involucrados en la adipogénesis. El grupo de Dennery fue el primero en reportar la localización nuclear de HO-1 en cultivos de células NIH3T3 expuestas a hipoxia después de sufrir clivaje lo que favorecería su entrada al núcleo (Lin Q. et al. 2007). Estos autores también demostraron que su función protectora frente a la hipoxia puede llevarse a cabo mediante una forma de HO-1 que no posee actividad enzimática, sugiriendo otro rol de HO-1 independiente de la degradación del hemo (Lin Q. S. et al. 2008). Se propuso que la translocación al núcleo media la activación de numerosos factores de transcripción de respuesta al estrés oxidativo; sin embargo, no se conoce el mecanismo involucrado en dicha activación transcripcional (Lin Q. et al. 2007).

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado por primera vez la localización nuclear de HO-1 en muestras humanas de carcinoma primario de próstata y HPB por estudios de inmunohistoquímica (Sacca et al. 2007) y en líneas celulares de PCa (Gueron et al. 2009). Con respecto a su función nuclear independiente de la actividad enzimática de HO, hemos propuesto por primera vez una función en la regulación de procesos claves en la carcinogénesis y en la progresión del PCa, como son la disminución de la proliferación, la migración y la invasión *in vitro* y la reducción del tamaño tumoral y de la vascularización *in vivo* (Gueron et al. 2009; Ferrando et al. 2011). Sin embargo, el mecanismo por el cual HO-1



lleva a cabo estas funciones, más allá de la citoprotección ejercida por los productos de su actividad enzimática, no se ha dilucidado completamente.



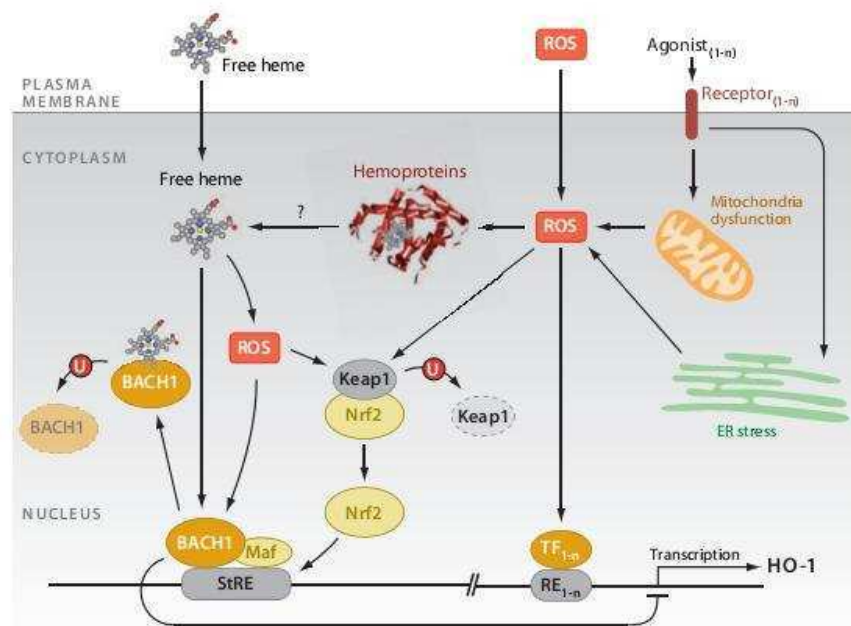
**Figura 16.** Diagrama de la compartimentalización celular de HO-1. El CO podría inhibir la enzima ciclo oxigenasa (COX) en la mitocondria. En las caveolas podría participar en la regulación de la unión de caveolina 1 (Cav-1) a sus proteínas asociadas, como receptores de muerte (DRs) y la NADPH oxidasa (NOX). En el retículo puede atenuar el estrés del retículo. Finalmente en el núcleo se ha sugerido su participación en la regulación de la transcripción de genes. (Adaptado de Kim y colaboradores (Kim H. P. *et al.* 2011)).

### Regulación de la expresión de HO-1

HO-1 se expresa en grandes cantidades en hígado y bazo y puede llegar a ser casi indetectable en otros tejidos (Jozkowicz *et al.* 2007). Sin embargo, esta isoforma se caracteriza por la capacidad de inducirse por su sustrato el grupo hemo y por una amplia diversidad de estímulos, incluyendo radiación ultravioleta, hipoxia, inflamación, metales pesados, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (Prawan *et al.* 2005); constituyendo así uno de los más importantes genes citoprotectores frente a diferentes agresiones celulares.

La expresión de HO-1 es regulada principalmente a nivel transcripcional con algunas excepciones que provocan la estabilización del ARNm (Gozzelino *et al.* 2010). La transcripción del gen de HO-1, *Hmox1*, puede ser inducida por una gran cantidad de vías de señalización que activan diferentes factores de transcripción. Entre ellos encontramos a NFκB, el Factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y AP-1 (Alam y Cook 2007). Ellos reconocen elementos específicos en el DNA localizados en las regiones proximales (-0,3Kb) y distales (-4Kb, enhancer E1 y -10Kb, enhancer E2) del promotor de *Hmox1*. La secuencia dominante en estos enhancers es el elemento de respuesta a estrés (StRE) (Sikorski *et al.* 2004), el cual es estructural y funcionalmente similar a los elementos de respuesta a pequeñas proteínas Maf

(MARE) y a los elementos de respuesta a anti-oxidantes (Morse et al. 2009). Los principales factores en la regulación de la expresión de HO-1 y que se asocian a estas secuencias MARE son Nrf2 y Bach (“BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1”), ambos miembros de la familia de factores de transcripción cierre de leucina básico, capaces de hetero-dimerizar con Maf. Nrf2 es un factor que activa la transcripción de genes conocidos como detoxificantes de fase II que incluyen agentes anti-oxidantes, enzimas que detoxifican xenobióticos y otros factores citoprotectores frente al estrés celular (Itoh et al. 1997). Esta proteína contiene un dominio activador que regula positivamente a HO-1, mientras que Bach compete con este factor y reprime la transcripción del gen. Bach es secuestrado en citoplasma por la proteína represora “kelch-like ECH-associated protein-1” (Keap1) la cual adicionalmente promueve la degradación de Nrf2 (Ryter y Choi 2009). Se ha propuesto que Keap1 puede actuar como un sensor del estado oxidativo debido a la oxidación reversible de cisteínas críticas (Dinkova-Kostova et al. 2002). Frente a un estímulo Keap1 libera a Nrf2, el cual migra al núcleo y compete con Bach por la asociación a Maf en los elementos StRE. La proteína Bach tiene sitios de unión a hemo, por medio de los cuales este compuesto induce cambios conformacionales liberando a Bach de los elementos StRE y promoviendo su degradación en citoplasma. Del mismo modo Bach es susceptible a sufrir modificaciones redox en sus grupos sulfhidrilos y liberarse en función del estrés oxidativo (Gozzelino et al. 2010) (Fig. 17).



**Figura 17.** Esquema de la regulación transcripcional de HO-1. (Adaptado de Gozzelino y colaboradores (Gozzelino *et al.* 2010))

Estos elementos regulatorios han sido descritos primero en ratón y luego se han detectado con gran homología en el gen humano, con diferencias principalmente en la diversidad de elementos de respuesta a factores de transcripción (Morse et al. 2009). A diferencia de Hmox1 murino, el gen humano se induce en respuesta a cadmio. Se reportó la existencia de una secuencia de 10 pb, que ha sido reconocida como un elemento de respuesta a este metal, localizada en el E1 (Morse et al. 2009). En la región de 4 Kb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción, se encontraron sitios de asociación para la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) (Kronke et al. 2003), mientras que en la región de -9,5 Kb se encontraron elementos blanco de Egr1 (early growth response-1) que median la respuesta a metaloporfirinas (Yang G. et al. 2001). Adicionalmente se describió la presencia de un gran número de elementos en la región promotora proximal que incluyen sitios de unión, entre otros, para ETS (Deramautd et al. 1999), para NFκB (Lawrence et al. 2012) y para STAT3 (Deramautd et al. 1999). Esta posibilidad de la interacción cooperativa entre múltiples factores de transcripción revela la complejidad en la regulación de este gen en humanos (Ryter y Choi 2009). Estudios de Lin y colaboradores propusieron que la misma proteína HO-1 podría regular su propia expresión en forma de retroalimentación positiva, importante para la inducción del gen en respuesta al estrés oxidativo (Lin Q. S. et al. 2008).

## **II.2 Rol fisiológico de HO-1 en procesos celulares**

A pesar de que HO-1 fue inicialmente descrita como la enzima que cataliza la degradación del grupo hemo, sus roles se han extendido hacia actividades anti-inflamatorias, anti-proliferativas y anti-apoptóticas en diferentes tejidos, órganos y condiciones.

HO-1 es un mediador crítico de la homeostasis celular, esto se ve reflejado en la expresión ubicua de esta proteína, así como por la gran diversidad de estímulos de estrés celular que la inducen. La importancia biológica de HO-1 se manifiesta en las alteraciones que se han observado asociadas a la falta de esta proteína en modelos experimentales. En ratones Hmox1<sup>-/-</sup> se ha detectado una destacada tendencia pro-inflamatoria en comparación con los animales wild-type (Kapturczak et al. 2004). Del mismo modo se ha reportado la incapacidad de los ratones carentes de HO-1 para resolver patologías, en comparación con los animales que sobre-expresan esta proteína (Soares y Bach 2009). En humanos la deficiencia en HO-1 es una condición severa, como se demuestra por los dos únicos casos de ausencia de esta proteína que presentaron inflamación crónica, patologías endoteliales, nefritis y graves alteraciones en el bazo (Yachie et al. 1999; Radhakrishnan et al. 2011). Los polimorfismos en la región del

microsatélite (GT)<sub>n</sub> del promotor de HO-1 que ocasionan en el gen una menor capacidad de inducirse, se han correlacionado con la incidencia y la progresión de varias enfermedades (Ryter y Choi 2009; Soares y Bach 2009; Gozzelino et al. 2010).

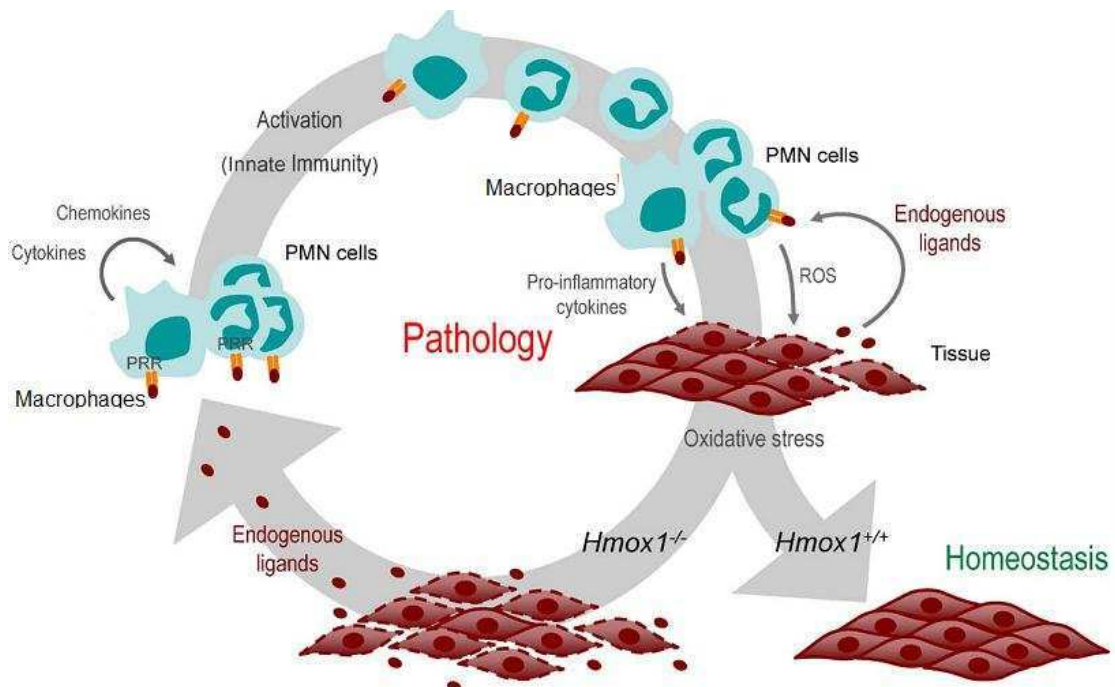
Como detallamos previamente (sección II.1), HO-1 degrada al grupo hemo en tres productos biológicamente activos (Fe, Biliverdina y CO) y de este modo muchas de las características citoprotectoras se han atribuido a los mismos. Sin embargo, últimamente se ha propuesto que HO-1 puede ejercer ciertas funciones independientemente de su actividad catalítica (Lin Q. et al. 2007; Lin Q. S. et al. 2008).

### HO-1 y la inflamación

HO-1 ha sido descrita como una proteína anti-inflamatoria e inmunosupresora. La principal evidencia proviene de ratones carentes de esta proteína que desarrollan reacciones inflamatorias crónicas y cuyas células inmunes producen una tasa mayor de mediadores inflamatorios en comparación con los animales controles (Kapturczak et al. 2004). Algunos de los efectos anti-inflamatorios atribuidos a HO-1 son consecuencia de la producción de CO, que lleva a la activación de la guanilato ciclasa e inhibición de la agregación plaquetaria (Furchgott y Jothianandan 1991), así como también a la disminución en la síntesis de citoquinas, probablemente a través de las vías de p38 MAPK o JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Otterbein et al. 2000; Morse et al. 2003).

Adicionalmente, nuestro grupo y otros investigadores demostraron la disminución en la activación de la vía pro-inflamatoria mediada por NFκB tanto por CO como por HO-1 (Megias et al. 2007; Ferrando et al. 2011). También se reportó que HO-1 participa en la inducción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Otterbein et al. 2000). Evidencias previas sugieren que HO-1 podría regular la respuesta inmune a través de la modulación en la respuesta de células T. La inducción de HO-1 suprime la activación y la proliferación de linfocitos T CD 4<sup>+</sup> (Pae et al. 2004), sin embargo, Biburger y col (Biburger et al. 2010) demostraron que si bien HO-1 era capaz de regular la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> in vitro, no modificaba la función moduladora de estas células. Las células Treg (linfocitos T regulatorios), las cuales producen de forma constitutiva HO-1, son críticas en la modulación de la respuesta inmune. Se ha observado que la inhibición de esta proteína suprime la función de Treg in vitro (Choi et al. 2005). Esto tiene relevancia, por ejemplo en la tolerancia a transplantes. En este contexto se ha reportado el rol benéfico de HO-1 en la protección al rechazo de órganos (Soares y Bach 2007). También se demostró la capacidad de HO-1 para regular enfermedades autoinmunes (Tzima et al. 2009). Koliaraki y colaboradores

recientemente describieron un mecanismo para esta regulación de la inmunidad innata, que no se basa solo en los subproductos de HO-1, sino que propone que en células mieloides HO-1 interactúa con el factor de transcripción IRF3 (Factor regulador del interferón 3) regulando la expresión de citoquinas. Se demostró así que la deficiencia de HO-1 lleva a una respuesta alterada a infecciones y a enfermedades autoinmunes órgano específicas (Koliaraki y Kollias 2011). Del mismo modo el grupo de Soares y colaboradores proponen a HO-1 como un regulador importante de la autoinmunidad generada en los tejidos sometidos a enfermedades inflamatorias, en donde HO-1 contribuye a la homeostasis mediante la disminución de la respuesta inflamatoria a nivel del sistema inmune innato y adaptativo (Soares y Bach 2009) (Fig. 18).



**Figura 18.** Efecto citoprotector de HO-1. La activación de las células inmunes, incluyendo células polimorfo-nucleares (PMN) y macrófagos, está asociada a la producción de ROS y citoquinas pro-inflamatorias, provocando estrés oxidativo. La expresión de HO-1 en respuesta al estrés oxidativo es citoprotectora y previene la liberación de ligandos endógenos pro-inflamatorios de las células dañadas, lo que favorece la resolución de la inflamación y el retorno a la homeostasis. Cuando se pierde la expresión de HO-1 ( $Hmox1^{-/-}$ ) el estrés oxidativo conduce a la muerte celular programada generalizada (citotoxicidad), dando como resultado la liberación de ligandos endógenos pro-inflamatorios. Estos ligandos mantienen la activación de las células inmunes (inflamación) y exacerbaban la lesión del tejido, un efecto que promueve el desarrollo de enfermedades autoinmunes inflamatorias. (Figura adaptada de Soares (Soares y Bach 2009).

### HO-1 y la angiogénesis

La angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes, es un paso clave en diversos procesos fisiológicos como patológicos, como la inflamación, la reparación de heridas, el crecimiento tumoral y la metástasis. Existen varios estudios que demuestran la importancia de HO-1 en la angiogénesis (Loboda et al. 2008; Ferrando et al. 2011).

Este proceso se basa en la migración y la proliferación de células endoteliales maduras, las cuales son estimuladas por factores de crecimiento de los cuales el principal es VEGF (Ferrara et al. 2003). Se ha demostrado que HO-1 ejerce un efecto sobre la síntesis de VEGF en las células vasculares del músculo liso (VSMC) bajo condiciones de hipoxia y de normoxia (Dulak et al. 2002). La inhibición de la actividad de HO-1 por SnPP (estaño proto-porfirina IX), previno completamente la generación de VEGF inducida por citoquinas e hipoxia (Dulak et al. 2002). Adicionalmente a esta observación, recientemente se demostró que HO-1 media el efecto del factor SDF-1 (Factor derivado del estroma tipo 1) en el reclutamiento de células progenitoras de vasos a los sitios de isquemia (Deshane et al. 2007). Una conexión importante entre HO-1 y la homeostasis durante la formación de vasos reside en la producción de HIF (Factor inducible por hipoxia) por las células endoteliales expuestas a bajas concentraciones de oxígeno. HO-1 posee en su promotor elementos de respuesta a HIF y se demostró que la expresión aumentada de HO-1 por este factor modula la inflamación que afecta al tejido durante la isquemia/reperfusión, disminuyendo así la zona afectada (Ockaili et al. 2005). Sin embargo, se observaron situaciones en las cuales HO-1 modula negativamente la angiogénesis. En general ello ocurre en un contexto inflamatorio, donde la formación de vasos sanguíneos inducidos por la inflamación es atenuada por la sobre-expresión de HO-1 (Bussolati y Mason 2006). Estos datos sugieren que los productos de la actividad de HO-1 actúan como factores pro-angiogénicos solamente cuando la expresión ocurre en un ambiente libre de reacciones inflamatorias. Cuando la inflamación dispara la formación de vasos sanguíneos, la influencia de HO-1 en este mismo proceso es inhibitoria (Bussolati y Mason 2006).

Hallazgos recientes de nuestro laboratorio demostraron como la sobre-expresión de HO-1 disminuye la angiogénesis en la situación patológica de la progresión tumoral, en donde la inoculación intradérmica de células de PCa que sobre-expresan HO-1 generó tumores menos vascularizados que el grupo control. Esto se correlacionó con una disminución de la expresión en genes pro-angiogénicos. Se propuso un mecanismo que consiste en que la inducción de HO-1 conduce a una disminución en los niveles de ROS intracelulares y a su vez a una represión en la activación de la vía de señalización de NFκB (Ferrando et al. 2011).

### HO-1 en la apoptosis y la proliferación

El rol de HO-1 en la proliferación celular depende de la situación y del tipo celular en que esta molécula es inducida. HO-1 ejerce una actividad anti-proliferativa sobre las VSMC, mediada probablemente por el CO que aumenta el GMPc (Morita et al. 1995), mientras que estimula la proliferación de las células endoteliales (Soares et al. 2002). En células mesangiales glomerulares, sometidas a estímulos pro-proliferativos, HO-1 modula negativamente esta inducción en la proliferación (Kumar D. et al. 2010). También disminuye la proliferación, por alterar la vía de señalización de ERK2, en células pancreáticas estrelladas, que son células que pasan de un estado quiescente a un estado proliferativo en la fibrosis pancreática (Schwer et al. 2008). Del mismo modo inhibe la proliferación de las células T CD4+ por medio de la inhibición en la secreción de IL-2 (Pae et al. 2004), regulando la respuesta inflamatoria. Previamente nuestro grupo de trabajo demostró la regulación en la proliferación de células de PCa provocada por la sobre-expresión de HO-1 (Gueron et al. 2009).

En cuanto a la apoptosis, HO-1 tiene un rol más definido hacia impedir este proceso, en general, ejerciendo un efecto protector hacia el tejido involucrado. Se ha observado que la sobre-expresión cardíaca de HO-1 limita la apoptosis de los cardiomiocitos después de la isquemia/reperfusión (Vulapalli et al. 2002). También tiene un efecto protector en células endoteliales (Brouard et al. 2000), particularmente fue capaz de proteger células endoteliales retinales frente a la apoptosis inducida por la alta glucosa (Castilho et al. 2012). Los mecanismos por los cuales HO-1 disminuye la muerte celular son diversos, muchos de ellos son mediados por el CO a través de la vía de p38 MAPK, como lo sugiere el hecho de que el bloqueo farmacológico de esta vía suprime el efecto anti-apoptótico de HO-1 (Brouard et al. 2000). La activación de p38 por HO-1 también induce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl xL (Linfoma de células B extra largo), vía PI3K/Akt (Arruda et al. 2004). HO-1 adicionalmente inhibe factores pro-apoptóticos como Bax y Bak (Katori et al. 2002; Tang et al. 2004).

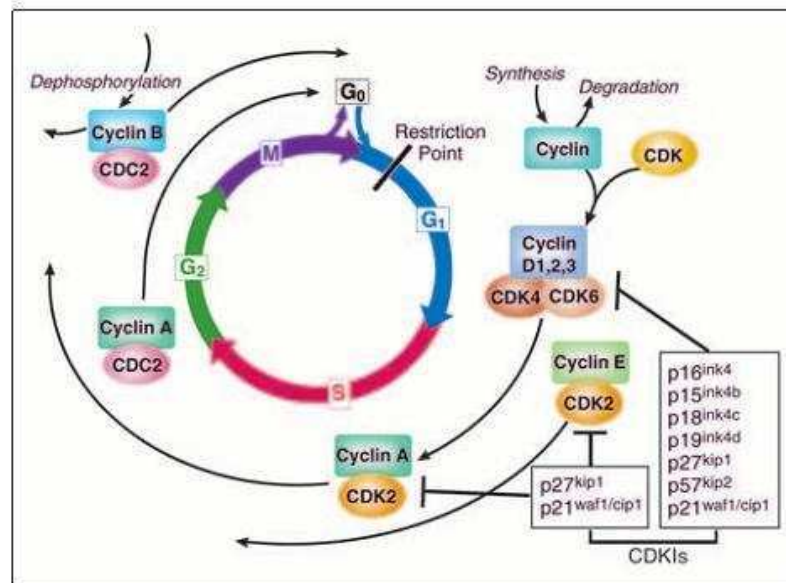
La variación frente a la inducción de HO-1 en las repuestas inflamatorias, angiogénicas, proliferativas y de supervivencia celular, podrían ser consecuencia de la diversidad de situaciones en que esta proteína se induce, que conllevan a un perfil de expresión génica determinado para permitir un mejor ajuste de la respuesta final (Wegiel et al. 2008). Esta versatilidad es importante si se considera a HO-1 como un factor central en el restablecimiento de la homeostasis tras ser inducida en un amplio rango de condiciones patológicas (Soares y Bach 2009).

### HO-1 y el ciclo celular

La progresión del ciclo celular es un mecanismo de regulación crítico de los procesos de proliferación así como de división celular después del daño en el ADN. Este proceso es dividido típicamente en cuatro fases, los períodos asociados con la síntesis de ADN (fase S) y la división celular (fase M) están separados por dos “gaps” llamados G1 y G2, respectivamente. La progresión a través del ciclo se promueve por el ensamblaje de quinasas dependientes de ciclinas (cdk) y proteínas regulatorias llamadas Ciclinas. Hay proteínas inhibitorias del ciclo, que pueden ser agrupadas en dos familias distintas. El primer grupo comprende a los miembros de la familia INK4 que actúan como inhibidores específicos de cdk 4 y cdk 6 e inducen p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup>. El segundo grupo comprende a los miembros de la familia p21<sup>CIP1/WAF1</sup> y p27<sup>Kip1</sup> que bloquean la progresión del ciclo celular inhibiendo a los complejos cdk/Ciclinas D, A y E. Las señales extracelulares que inhiben el crecimiento o lo promueven son integradas en la fase G1. Existen al menos nueve cdk (1-9) y múltiples Ciclinas (A-T) (Dickson y Schwartz 2009). Complejos específicos entre las cdk y las Ciclinas regulan cada fase del ciclo correspondiendo las Ciclinas D1–D3/cdk 2, 4, y 6 a la progresión a través de G1; la Ciclina E/cdk 2 controla la entrada en la fase S; la Ciclina A/cdk 2 controla la progresión a través de S; Ciclina A/cdk 1 (también conocida como cdc2) controla G2; y Ciclina B/cdk 1 facilita la mitosis (Dickson y Schwartz 2009) (Fig. 19).

La supervivencia de las células al daño en el ADN está regulada por la transición a través de los puntos de control. En las células de cáncer la primera transición suele estar desregulada, por lo que tiene gran importancia la regulación en la transición G2/M. Este punto de control involucra la activación de una fosfatasa llamada Cdc 25 que en condiciones favorables remueve fosforilaciones inhibitorias en el complejo Ciclina B/cdk 1. El daño en el DNA lleva a la activación de muchas quinasas que impiden esta transición fosforilando este complejo. A su vez puede ocurrir la regulación del mismo por la retención de Cdc 25 en el citosol. La proteína 14-3-3 $\sigma$ , media el arresto provocado por P53 frente al daño en el ADN, reconociendo a Cdc 25 fosforilada e impidiendo su acceso al complejo Ciclina B/cdk 1 en el núcleo (Cann y Hicks 2007). Sin embargo, recientemente se ha vinculado la inducción de 14-3-3 $\sigma$  mediada por otras proteínas de la familia de p53 en aquellos tumores de mama que tienen mutaciones en este importante gen regulador (Sang et al. 2006).





**Figura 19.** Regulación de la progresión del ciclo celular (Figura adaptada de Schwartz y colaboradores (Schwartz y Shah 2005).

Teniendo en cuenta la participación de HO-1 en el control de la proliferación, su rol en la progresión del ciclo celular ha sido estudiada en diversos modelos.

La elevada proliferación de las células musculares en los vasos sanguíneos se ha considerado un factor importante en la predisposición a la hipertensión arterial. Duarte y colaboradores (Durante 2003) describieron los efectos benéficos de la inducción de HO-1 en este modelo. HO-1 disminuyó la proliferación de las VSMC llevando a un aumento en los niveles de p21<sup>CIP1/WAF1</sup> y a una disminución de Ciclina D1 en estas células tanto in vitro como in vivo (Jeon et al. 2009). Adicionalmente se demostró que la inducción de HO-1 aumentaba los niveles del inhibidor p27<sup>Kip1</sup> en estas mismas células (Li W. et al. 2005). En el caso de las células endoteliales donde HO-1 estimula la proliferación se ha observado que la inducción de esta proteína provoca una disminución de p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (Li Volti et al. 2005).

En astrogliá, en músculo liso vascular, en epitelio tubular proximal y en carcinoma de mama, la activación de HO-1 resultó en el arresto del crecimiento celular y este efecto a su vez se asoció a la inducción de p21<sup>CIP1/WAF1</sup>. Estos eventos provocaron una disminución de la proliferación y confirieron marcada resistencia a la apoptosis contribuyendo de esta manera a un patrón alterado del crecimiento y la muerte celular (Gonzalez-Michaca et al. 2004; Was et al. 2006).

### II.3 HO-1 y el PCa

Al hacer una revisión de cómo afecta HO-1 a los diferentes procesos celulares, se puede ver que su efecto varía dependiendo del tejido y del contexto en que se estudie. Del mismo modo en tumores se encuentra información controvertida en cuanto a si HO-1 ejerce un rol protector frente al cáncer o lo promueve. Aún cuando la función de HO-1 en esta enfermedad es discutida, la importancia de esta proteína en cáncer queda en evidencia al observar la expresión alterada de esta proteína en muchos tipos de tumores incluyendo páncreas (Berberat et al. 2005), glioblastoma (Deininger et al. 2000), hepatoma (Doi et al. 1999), adenocarcinoma (Goodman et al. 1997), melanoma (Torisu-Itakura et al. 2000) o PCa (Sacca et al. 2007).

En algunos tipos de cáncer se propone que HO-1 podría promover la proliferación de las células tumorales como es en el caso del cáncer de páncreas (Sunamura et al. 2003) y de melanoma (Was et al. 2006), en los que se observan mayores volúmenes tumorales o aumento en el número de células cancerosas. En el cáncer de cabeza y cuello (Gandini et al. 2012), en el cáncer de pulmón (Degese et al. 2012), así como en el cáncer gástrico (Yin et al. 2012) se asoció o bien la localización nuclear o bien la expresión aumentada de esta proteína con una mayor malignidad. También se correlacionó su inducción a la capacidad transformante del virus de sarcoma de Kaposi (Marinissen et al. 2006). Por otro lado, en pacientes con cáncer colorrectal la expresión de esta proteína se asoció con la disminución de la invasión tumoral a nódulos linfáticos (Becker et al. 2007) y a una disminución en el riesgo de metástasis en carcinoma oral de células escamosas (Tsuji et al. 1999). Adicionalmente *in vitro* la inducción de HO-1 promueve la apoptosis en cultivos primarios de metástasis de este último tipo de cáncer (Lee Y. M. et al. 2010).

Se propone actualmente que HO-1 promueve el crecimiento tumoral a través de un aumento en la angiogénesis (Jozkowicz et al. 2007; Abraham y Kappas 2008; Grochot-Przeczek et al. 2012). Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo recientemente demostramos tanto *in vivo* como *in vitro* que en PCa la sobre-expresión de HO-1 atenúa la angiogénesis por un mecanismo mediado por la alteración en la activación de la vía de NFκB (Ferrando et al. 2011).

En PCa es muy frecuente la delección del supresor tumoral PTEN. Estudios realizados por Li y colaboradores, en muestras de dos cohortes de pacientes con PCa localizado y con CRPC demostraron que la co-ocurrencia de la delección de PTEN y la sobre-expresión de HO-1 en los tumores se asociaba a la progresión de la enfermedad (Li Y. et al. 2011). De modo similar en estudios histológicos de muestras de PCa se evidenció un aumento de HO-1 en los

tumores resistentes a la castración (Alaoui-Jamali et al. 2009). En contraste con estos resultados en diferentes grupos se encontró que compuestos quimioterápicos podrían mediar sus efectos a través de la inducción de HO-1 (Terazawa et al. 2010; Kwok et al. 2012) y que dicha inducción juega un rol clave en la regulación de la malignidad del PCa, provocando disminución en el tamaño tumoral y de la angiogénesis in vivo (Gueron et al. 2009; Ferrando et al. 2011), por inhibición de NFκB (Ferrando et al. 2011). Estos resultados son similares a los demostrados por Ilaria Bellezza (Bellezza et al. 2012) en células PC3, en las cuales el aumento de HO-1 por un compuesto derivado de la vitamina E, disminuye la viabilidad de las células tumorales mediante la inhibición de la translocación nuclear de NFκB y por ende de su capacidad de unirse al ADN.

En resumen, los efectos de HO-1 podrían promover o atenuar el crecimiento tumoral o la metástasis dependiendo del entorno celular, el estado inflamatorio del tejido (Jozkowicz et al. 2007; Gueron et al. 2012) y de la variación genética existente dentro del tumor. Recientes descubrimientos llevados a cabo por Kozakowska y colaboradores (Kozakowska et al. 2012) demostraron que HO-1 es capaz de regular subpoblaciones de miRNA modificando patrones de diferenciación. Estos nuevos mecanismos podrían ayudar a explicar funciones de HO-1, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, que no han sido develadas hasta ahora (Grochot-Przeczek et al. 2012).

En resumen, todos estos hallazgos indican que HO-1 posee un rol anti-tumoral en el PCa. En este trabajo de tesis intentaremos aportar evidencias sobre la función de la localización nuclear de esta proteína.

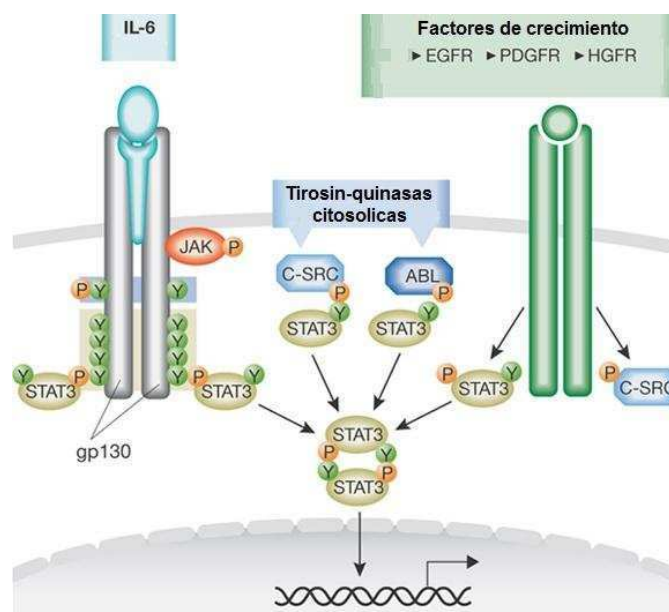
### **III. STAT3**

STAT3 pertenece a la familia de proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs). Estas proteínas median las respuestas celulares a citoquinas, a factores de crecimiento y a hormonas. Se han descrito en mamíferos hasta la fecha siete diferentes STATs: Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5  $\alpha$ , Stat5  $\beta$  y Stat6 (Stark y Darnell 2012). Este factor de transcripción posee los dominios típicos de las proteínas STATs, que incluyen un dominio N-terminal de interacción con otras proteínas, un dominio de unión al ADN y un dominio SH2 de interacción que le permite reconocer sitios fosforilados (Heinrich et al. 1998; Germain y Frank 2007).

### III.1 Vía de señalización de STAT3

La señalización clásica de STAT3 involucra la unión de una citoquina a su receptor seguido por la activación de una janus quinasa (JAK) asociada o adicionalmente la unión de un factor de crecimiento a su receptor que posee actividad quinasa intrínseca. En ambos casos esta actividad quinasa fosforila la región citoplasmática de los receptores y provee sitios de reconocimiento para los dominios SH2 presentes en STAT3. De esta forma estas proteínas que se encuentran en citoplasma en forma latente, son reclutadas y fosforiladas en un residuo tirosina específico, Tyr<sup>705</sup>, en el dominio C-terminal. Esto les permite homo-dimerizar y migrar al núcleo para unirse a elementos de respuesta específicos en el ADN (Johnston y Grandis 2011). En condiciones normales tanto la amplitud como la duración de la activación de STAT3 inducida por el receptor, están estrechamente controladas por una diversidad de proteínas reguladoras endógenas, como los inhibidores PIAS (proteínas inhibidoras de STAT3 activado) (Shuai 2006) o los inhibidores SOCS (supresores de la señalización de citoquinas) (Wormald y Hilton 2004).

Originalmente STAT3 fue identificado como mediador de la vía de IL-6; sin embargo, ahora se sabe que se activa por una amplia gama de factores de crecimiento como EGF (Park et al. 1996), c-Met (proto-oncogene que codifica para el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos) (Hung y Elliott 2001) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) (Masamune et al. 2005), entre otros. También puede ser activado por hormonas (Bates et al. 2004) e incluso por quinasas intracelulares como Src y ABL (Parsons y Parsons 1997; Danial y Rothman 2000) (Fig. 20).



**Figura 20.** Vía de señalización de STAT3. (Esquema adaptado de Bollrath (Bollrath y Greten 2009)).

### III.2 STAT3 y la carcinogénesis

Existen muchas evidencias que permiten proponer a la desregulación de la vía de STAT3 como un evento central en el desarrollo y progresión de muchos tumores humanos. La transfección y expresión de STAT3 es suficiente para llevar a la transformación a fibroblastos inmortalizados y a células epiteliales normales derivadas de mama y próstata (Bromberg et al. 1999). La transformación celular provocada por el oncogén viral v-src, requiere de la activación de STAT3 (Silva 2004). Adicionalmente se ha encontrado a STAT3 activado en tumores y en líneas establecidas a partir de tumores humanos (Johnston y Grandis 2011) En particular, STAT3 está constitutivamente activa en el 69% de los cánceres de mama (Dolled-Filhart et al. 2003), en el 82% de los tumores de próstata (Mora et al. 2002), entre el 82 y el 100% de los carcinomas de cabeza y cuello (Nagpal et al. 2002) y en el 71% de los cánceres nasofaríngeos (Hsiao et al. 2003).

La activación de la vía ocurre como resultado de las mutaciones, así como también por medio de estimulación de las células inmunes y estromales del microambiente tumoral (Yu et al. 2009; Grivennikov et al. 2010). Una vez activada esta vía en las células tumorales o en las estromales, STAT3 puede inducir la expresión de un subtipo de genes cuyos productos son importantes para mantener su propia activación, incluyendo IL-6, IL-22, EGF, IL-23 e IL-10 (Kortylewski et al. 2009).

Consistente con este rol crítico en la oncogénesis, STAT3 regula muchos genes involucrados en la progresión del ciclo celular, en la apoptosis, en la angiogénesis y en la metástasis. Estos genes incluyen Ciclina D1, VEGF, MMP9, uPA y los genes anti-apoptóticos Bcl xL y Survivina (Huang S. 2007; Shodeinde y Barton 2012).

Además esta vía de señalización interactúa con otras vías de transducción de señales en las células de cáncer promoviendo la progresión del mismo, como se ha observado en células de hepatoma donde se demostró la interacción entre las vías de STAT3 y de TGF $\beta$  (Yamamoto et al. 2001). De modo similar se observó que la colaboración entre los factores SP1 (Proteína específica-1) y STAT3 conduce a la inducción de genes blanco en la carcinogénesis pancreática (Huang C. y Xie 2012).

Una interacción de relevancia en los procesos tumorales es la que ocurre entre los factores STAT3 y NF $\kappa$ B, que promueve en forma sinérgica la expresión de genes cuyos productos son críticos en la carcinogénesis (Grivennikov et al. 2010). STAT3 y NF $\kappa$ B pueden interactuar en situaciones diversas, por ejemplo STAT3 en su forma no fosforilada (vía no canónica) puede asociarse al complejo de NF $\kappa$ B-I $\kappa$ B en el citosol desplazando a la proteína

inhibitoria I $\kappa$ B y facilitando la entrada de NF $\kappa$ B al núcleo en ausencia de su señalización activadora (Yang J. et al. 2007). En otro escenario STAT3 puede asociarse a p65 en el núcleo reclutando a p300 (complejo acetil-transferasa) y permitiendo la acetilación de histonas. Ésta asociación también promueve la acetilación de p65 que provoca su retención nuclear y prolonga su actividad transcripcional. De este modo las células tumorales con STAT3 activado se aseguran de mantener también la activación de la vía de NF $\kappa$ B (Lee H. et al. 2009a; Grivennikov y Karin 2010).

### **III.3 STAT3 y el PCa**

En el PCa se propone que la activación desregulada de STAT3 es responsable de la progresión neoplásica de las células prostáticas (Barton et al. 2001). Esto es consistente con la detección de STAT3 constitutivamente activo en muestras de PCa (Abdulghani et al. 2008). Además su activación se ha asociado a los estadios avanzados de la enfermedad (Horinaga et al. 2005). Varios grupos de investigación reportaron que STAT3 está implicado en promover la proliferación e inhibir la apoptosis de las células de PCa (Mora et al. 2002; Lee S. O. et al. 2004) y que podría emplearse a pSTAT3 como un marcador para detectar cáncer en pacientes cuyas biopsias inicialmente son diagnosticadas como negativas, pero que en una repetición de muestreo manifiestan el cáncer (Han G. et al. 2012).

#### Activación de la señalización de STAT por IL-6 en PCa.

El mecanismo por el cual se sugiere que STAT3 permanece activo en el PCa es a través de los niveles incrementados de IL-6 (Drachenberg et al. 1999). En la próstata sana IL-6 solo se expresa en las células basales, mientras que se ha observado la presencia de esta citoquina y de su receptor en la mayoría de los tumores de próstata (Hobisch et al. 2000). También se reportó la asociación entre los niveles elevados de IL-6 y menor supervivencia en pacientes con metástasis (Azevedo et al. 2011) y entre los niveles elevados de esta citoquina y mayor recurrencia de la enfermedad (Shariat et al. 2008). Asimismo, se detectaron altos niveles de IL-6 en los sobrenadantes de las células estromales apoyando la hipótesis de una estimulación paracrina de IL-6 en el PCa (Culig 2011). En líneas celulares de carcinomas prostáticos resistentes a la castración (PC3 y DU145) se observó que las células son capaces de secretar IL-6, el cual se comporta como un factor autocrino pro-proliferativo (Okamoto et al. 1997). En cambio, la línea sensible a andrógenos LNCaP es incapaz de secretar esta

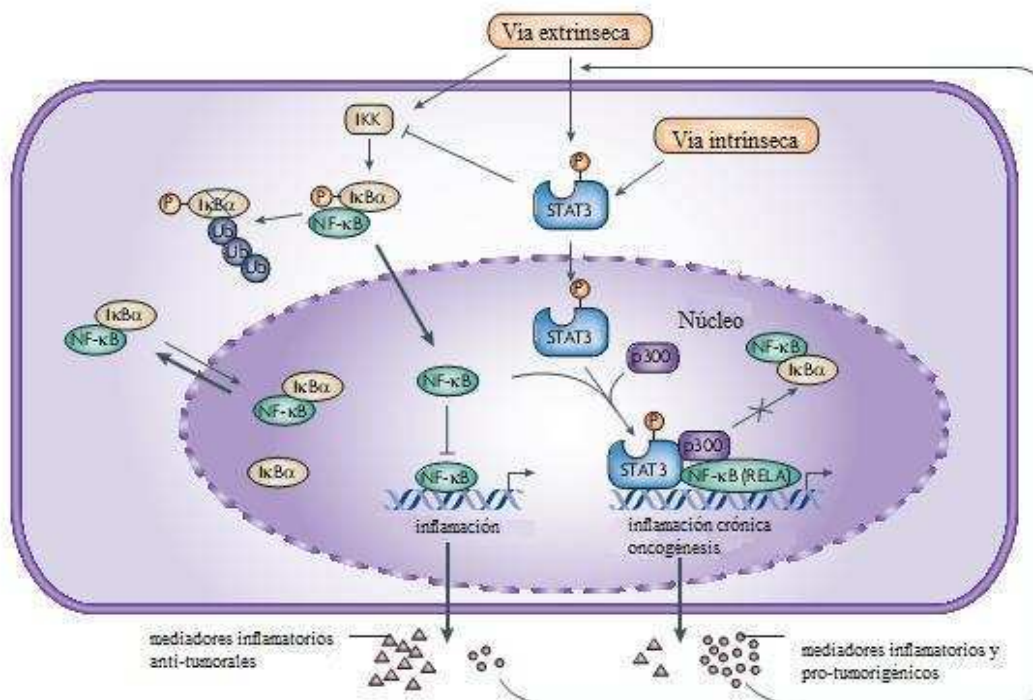
citoquina y la estimulación con la misma ha originado resultados ambiguos según el grupo de investigación (Giri et al. 2001; Jia et al. 2004). Una posible explicación para esta controversia es que el comportamiento de esta línea celular depende del microambiente y del sistema de cultivo. Estudios más recientes demostraron que el tratamiento con IL-6 lleva a las células de PCa a la diferenciación hacia un fenotipo neuroendócrino (Lee y col., 2007; Spiotto y col., 2000), considerado de mal pronóstico en el PCa porque posee la capacidad de secretar sustancias que influyen en el crecimiento del epitelio adyacente (Dasilva et al. 2012). A su vez se propone que la línea celular LNCaP expuesta durante un periodo de tiempo a IL-6 establece un loop autocrino (Lee S. O. et al. 2007), manteniendo de este modo la activación de la vía de STAT3 y promoviendo así la carcinogénesis.

#### **III.4 El microambiente inflamatorio y la tumorigénesis: NFκB y STAT3**

Como se mencionó en secciones anteriores las condiciones inflamatorias pueden dirigir la transformación oncogénica, y luego cambios genéticos y epigenéticos en las células pueden generar un microambiente inflamatorio que apoya la progresión tumoral. Se sugiere que STAT3 cumple un rol crítico en este mantenimiento de la inflamación pro-tumoral (Yu et al. 2009). Las citoquinas y quimoquinas son cruciales para inducir y mantener el microambiente inflamatorio promotor del cáncer. Estos mediadores son secretados principalmente por las células inflamatorias estromales. Pero la activación persistente de STAT3, intrínseca a las células tumorales (por medio de alteraciones genéticas), juega un rol importante en la estimulación de las células estromales para mantener esta condición inflamatoria. Esto se debe a que STAT3 estimula la secreción de numerosas citoquinas y factores de crecimiento por el tumor, que producen efecto en las células estromales estableciendo así una retroalimentación positiva para la inflamación (Yu et al. 2009). A su vez múltiples estímulos inflamatorios externos o extrínsecos como bacterias y virus también activan la vía de IL-6/STAT3 (Kortylewski et al. 2009; Samavati et al. 2009). Debido a su capacidad de inducir la expresión de una gran diversidad de mediadores inflamatorios en respuesta a distintos estímulos, NFκB es un factor central en la inflamación y se ha asociado con la respuesta inflamatoria pro-tumoral (Baud y Karin 2009). Es particularmente interesante el hecho de que ambos factores, STAT3 y NFκB, se encuentran interconectados en el cáncer a distintos niveles.

El ambiente inflamatorio activa a NFκB que estimula la síntesis de mediadores inflamatorios entre los cuales se incluye a la IL-6, promoviendo así la activación de STAT3.

Este último factor mantiene activo a NF $\kappa$ B (Lee H. et al. 2009a) y a sí mismo, mediante la inducción de la síntesis autocrina de IL-6 (Lee S. O. et al. 2007), ejerciendo en las células un efecto pro-tumoral. Adicionalmente STAT3 puede influir sobre la vía de NF $\kappa$ B, de modo tal que este factor inflamatorio promueva la tolerancia al tumor y a su vez impida la expresión de genes blanco de NF $\kappa$ B que favorecen la respuesta anti-tumoral mediada por los linfocitos Th1 (Kortylewski et al. 2005). Dos complejos típicos del factor NF $\kappa$ B son la asociación entre RELA-p50 y cREL-p50, mientras que el complejo con RELA está involucrado en la respuesta pro-tumoral, el complejo conteniendo cREL dirige predominantemente la expresión de genes para una respuesta tipo Th1. El complejo mayoritariamente activo en cáncer es RELA, esto se explicaría por la activación concomitante de STAT3 que favorece el reclutamiento de p300 junto a RELA y lo acetila reteniéndolo activo en el núcleo (Lee H. et al. 2009a). A su vez STAT3 es capaz de inhibir a la quinasa activadora de NF $\kappa$ B, IKK, que fosforila y degrada al inhibidor I $\kappa$ B (Yu et al. 2009). Sin embargo, todavía queda sin descubrir el mecanismo por el que STAT3 induce la expresión de solo el subgrupo de genes pro-tumorales en la vía de RELA y reprime otros genes inflamatorios. Finalmente, STAT3 y NF $\kappa$ B ambos activos en la misma célula, co-regulan numerosos genes oncogénicos e inflamatorios (Grivennikov y Karin 2010) (Fig 21).



**Figura 21.** En la fisiología normal, el factor NF $\kappa$ B es secuestrado en el citoplasma por el inhibidor de NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Cuando se activan las quinasas de I $\kappa$ B (IKKs) por patógenos y/o citoquinas pro-



inflamatorias, I $\kappa$ B es fosforilado y degradado, permitiendo la translocación nuclear de NF $\kappa$ B. STAT3, que también se activa por vías intrínsecas y extrínsecas, contribuye a la persistencia de la activación de NF $\kappa$ B en células transformadas, por la prolongación de la retención nuclear de RELA. NF- $\kappa$ B y STAT3 regulan la expresión de numerosos mediadores inflamatorios y oncogénicos. (Esquema adaptado de Yu y colaboradores (Yu *et al.* 2009))

### **III.5 Interacción entre STAT3 y el AR**

La transición del PCa desde la dependencia de andrógenos a la independencia hormonal es frecuentemente caracterizada por la sobre-expresión o hiper-activación del AR. Esta última causa puede ocurrir por la presencia de citoquinas, de factores de crecimiento o por interacción del AR con otras vías de señalización (Nadiminty y Gao 2012). Entre las citoquinas que pueden conducir a la activación del AR se ha demostrado la importante participación de IL-6. Esta citoquina se comprobó que está involucrada en promover la andrógeno-independencia por estimulación de la activación del AR en ausencia de ligando, así como también por actuar en forma sinérgica sobre el mismo a muy bajas concentraciones de andrógenos (Chen T. *et al.* 2000; Malinowska *et al.* 2009). Un mecanismo importante durante la transición a la resistencia a la castración es que el tejido tumoral se vuelve capaz de sintetizar pequeñas cantidades de hormona, lo que se conoce como la síntesis intracrina de andrógenos. Múltiples evidencias apoyan este concepto, principalmente el hecho de que la concentración de hormona intra-tumoral en CRPC alcanza valores que siguen estimulando la capacidad transcripcional del AR (Mostaghel y Nelson 2008). También se ha observado la activación de enzimas esteroideogénicas en metástasis de pacientes con CRPC respecto a los tumores primarios (Stanbrough *et al.* 2006; Montgomery *et al.* 2008). Es interesante destacar que la IL-6 también media la producción de andrógenos intra-prostáticos (Chun *et al.* 2009).

El mecanismo por el cual IL-6 co-activa al AR en las células de próstata es a través de la vía de señalización de STAT3 (Matsuda *et al.* 2001; Nadiminty y Gao 2012). A pesar de que la activación de la vía de MAPK puede tener un rol en la estimulación del AR (Yang L. *et al.* 2003), en muchos trabajos se ha demostrado que STAT3 media gran parte de este efecto (Chen T. *et al.* 2000). STAT3 interacciona físicamente con los receptores de las hormonas esteroides (Zhang Z. *et al.* 1997; Yamamoto *et al.* 2000; Proietti *et al.* 2011), aumentando la actividad transcripcional de los mismos en respuesta a sus ligandos (De Miguel *et al.* 2003; Proietti *et al.* 2011; Langlais *et al.* 2012). Mientras que para muchos de estos receptores nucleares se observó que la asociación con STAT3 colabora en la transcripción de sus genes

blanco sin esclarecer el mecanismo, en el caso particular del receptor de glucocorticoides (GR), el efecto sinérgico de STAT3 ocurre mediante un proceso en el cual uno de los factores de transcripción no actúa asociándose al ADN sino como co-factor de la otra proteína. En este contexto se determinó que STAT3 incrementa la actividad de GR unido a sus sitios en el ADN (Langlais et al. 2012). En células de PCa se demostró, que bajo el tratamiento con IL-6 en ausencia de testosterona, STAT3 se activaba, interactuaba con el AR e inducía la transcripción de sus genes blanco, indicando que la activación del AR independiente de ligando estimulada por IL-6 era mediada por STAT3 (Chen T. et al. 2000; Ueda et al. 2002). Sin embargo, también se comprobó que en respuesta a IL-6 y testosterona, STAT3 puede actuar como un co-activador del AR ejerciendo un efecto sinérgico con la hormona en la actividad transcripcional del AR. En este caso se comprobó que la interacción entre estas dos proteínas era dependiente de la estimulación hormonal (Chen T. et al. 2000; Matsuda et al. 2001). Estos mecanismos podrían permitir la proliferación de las células de PCa a bajas concentraciones de andrógenos o en ausencia de los mismos durante la ablación hormonal. Se demostró que el estímulo con testosterona aumentaba la transcripción de genes blanco de la vía IL-6/STAT3, por medio de la interacción de STAT3 con el AR. El tratamiento con el inhibidor flutamida suprimía el efecto sinérgico de AR sobre la transcripción mediada por STAT3 (Matsuda et al. 2001). Acorde con esas observaciones hallazgos posteriores llevados a cabo por Aaronson, indicaron que la testosterona estimula un loop autocrino de secreción de IL-6, que conlleva a un incremento en la expresión de STAT3 y un aumento de la asociación entre AR y STAT3 (Aaronson et al. 2007). De este modo ambas vías estarían interconectadas estimulándose ambas recíprocamente y en forma sinérgica. También se comprobó la activación del AR en respuesta a EGF mediada por STAT3, indicando así que varias vías pueden confluir para activar a este receptor hormonal y que muchas de ellas involucran la asociación entre AR y STAT3 (Aaronson et al. 2007).

Teniendo en cuenta todas estas observaciones podemos concluir que independientemente las vías de señalización de STAT3 y AR revisten gran importancia en la progresión del PCa y adicionalmente su interacción les permite estimularse mutuamente, estableciendo de este modo un sistema que se retroalimenta y que le confiere a las células capacidades oncogénicas. También es un punto importante a tener en cuenta como la inflamación, los mediadores y las vías involucradas colaboran con la asociación de STAT3 y AR, constituyendo de este modo una red muy difícil de bloquear dado que posee redundancia para sobrellevar la ausencia de componentes individuales. Por ello en la actualidad la investigación está cambiando el enfoque hacia aquellos tratamientos dirigidos a proteínas que

que participan en el mantenimiento de las vías que entrelazan varios caminos de señalización más que en la interrupción de cada una de ellas de forma aislada (He M. y Young 2009; Parray et al. 2012; Alva y Hussain 2013).

En resumen, la identificación de nuevos co-reguladores del AR y de las vías de señalización asociadas a la inflamación que disparan su independencia de andrógenos, es crucial para entender los mecanismos por los cuales HO-1 controla la tumorigénesis prostática.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

## **I. HIPÓTESIS**

El PCa es uno de los cánceres más frecuentes en el hombre y se considera una malignidad letal con gran incidencia en el mundo. Recientemente se ha propuesto que la inflamación, desencadenada por agentes infecciosos o la exposición a otros factores ambientales, aumenta la tumorigénesis del PCa.

El AR es un factor de transcripción que tiene un rol crítico en el desarrollo y la progresión de este tipo de cánceres. Este receptor se encuentra en el citoplasma unido a proteínas HSP. La unión a andrógenos provoca la disociación de estas proteínas, la dimerización del AR, la fosforilación por tirosina quinasas y su translocación al núcleo. Una vez dentro del núcleo, el AR se une a elementos ARE localizados en los promotores de los genes blanco, reclutando proteínas co-reguladoras y la formación del complejo de transcripción activo. Debido a que los co-reguladores pueden considerarse genes maestros que han evolucionado para coordinar múltiples reacciones celulares que participan en los principales procesos fisiológicos, también tienen el potencial de promover patologías por la coordinación errónea de diversas funciones independientes. Existen evidencias que indican que alteraciones en los co-reguladores influyen en la inflamación patológica, la replicación celular anormal y la carcinogénesis. En resumen, el estudio de estos genes maestros co-reguladores debería ser beneficioso para el tratamiento del cáncer.

STAT3, modulador de la expresión de genes inducidos por citoquinas, interactúa y activa la transcripción mediada por AR. Además, STAT3 constitutivamente activo se correlacionó con el potencial maligno en el PCa. Este factor es activado por condiciones inflamatorias.

La isoforma inducible de la hemo oxigenasa, la HO-1, confiere citoprotección contra el estrés oxidativo y la inflamación en varios modelos animales. Esta proteína ejerce funciones metabólicas vitales limitando la vía de degradación del hemo y participando en el mantenimiento de la homeostasis celular. Se ha descrito su localización nuclear, donde poseería una función no canónica, participando en la regulación de la actividad de factores de transcripción nucleares e incluso regulando su propia expresión. Reportes previos de nuestro laboratorio documentaron la función anti-tumoral de HO-1 en líneas celulares y en tumores xenotransplantados. Adicionalmente se comprobó que HO-1 modula negativamente la expresión de genes relacionados con la inflamación y la angiogénesis. Teniendo en cuenta que se ha demostrado la translocación nuclear de HO-1 en condiciones selectivas, nuestra hipótesis se basa en que esta proteína podría actuar como un co-regulador de receptores nucleares o bien

modificar el microambiente tumoral modulando la expresión de factores inflamatorios y angiogénicos que actuarían como co-reguladores de dichos receptores generando un fenotipo tumoral menos agresivo.

## **II. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el rol de la compartimentalización celular de HO-1 e identificar sus interactores y los mecanismos moleculares por los cuales esta proteína interrumpe a los mediadores pro-inflamatorios en la progresión del PCa.

## **III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar el efecto de la inducción de HO-1 sobre la progresión del ciclo celular en células de PCa.
2. Identificar la función nuclear de HO-1, como por ejemplo su posible asociación a promotores génicos a través de su interacción con factores de transcripción en células de PCa.
3. Evaluar el efecto de la inducción de HO-1 sobre la vía de señalización del AR en células de PCa.
4. Investigar el efecto de la inducción de HO-1 sobre la vía de señalización de STAT3 en células de PCa.
5. Estudiar el efecto de HO-1 sobre la vía de STAT3 in vivo.
6. Investigar el rol de la inducción de HO-1 en la interacción entre los factores de transcripción STAT3 y AR.
7. Determinar el rol de la inducción de HO-1 en la expresión y localización de NFκB.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## **I. MATERIALES**

### **I.1 Reactivos y drogas**

Se utilizaron los siguientes reactivos cuya procedencia se indica a continuación: Cloruro de Hemina equina (hemina) (Sigma Aldrich, USA), Ioduro de Propidio (Molecular Probe, Eugene, OR, USA), Kit para inmunohistoquímica LSAB + DAKO Peroxidasa (HRP) (DAKO Corp., California, USA), Medio de Montaje FluorSave™ Reagent (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), Taq DNA Polymerase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA, USA), kit RevertAid RT (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA, USA), Undecanoato de testosterona (SHERING, Buenos Aires, Argentina), IL-6 (Endogen, Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA), TRIAGENT (Molecular Re-search Center, Cincinnati, OH), Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Argentina), Polybrene Infection / Transfection Reagent (Millipore, Billerica, MA, USA).

### **I.2 Reactivos para cultivo**

El medio RPMI-1640 (con o sin rojo fenol) se compró en Invitrogen (Argentina) y la gentamicina en GIBCO BRL (Reino Unido). El suero fetal bovino (SFB) se adquirió en Internegocios (Argentina), la penicilina/streptomycin y L-glutamina en SIGMA (USA) y la tripsina en Invitrogen (Argentina).

### **I.3 Anticuerpos**

El anticuerpo monoclonal humano anti-hemo oxigenasa 1 desarrollado en ratón (OSA-110) y el anticuerpo policlonal humano anti-hemo oxigenasa 1 desarrollado en conejo (SPA-896) se adquirieron en Stressgen Biotechnologies Corp., San Diego, USA. El anticuerpo monoclonal humano anti-actina  $\beta$  se adquirió en Sigma-Aldrich, UK. El anticuerpo monoclonal anti-p27<sup>KIP1</sup> (NA51) se compró en Oncogene, La Jolla, CA, USA. El anticuerpo monoclonal anti-pSTAT3 (9145) fue adquirido en Cell signaling, Massachusetts, USA. El anticuerpo policlonal anti-p65 (R1487P) se compró en Acris (San Diego, CA, USA): Los anticuerpos policlonal anti-Ciclina A (sc-596), monoclonal anti-Ciclina B (sc-245), policlonal anti-E2F1 (sc-193), policlonal anti-14-3-3 $\sigma$  (sc-7683), policlonal anti-p21<sup>WAF/CIP1</sup> (sc-397), policlonal STAT3 (sc-7179), monoclonal anti-AR (sc-7305) y monoclonal anti-lamina A/C



(sc-7292), se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se compraron en Amersham Ltd, Reino Unido (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Alexa Fluor 488 cabra anti-ratón y Alexa Fluor 555 cabra anti-conejo fueron adquiridos en Molecular Probes (Invitrogen, Argentina).

#### I.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se detallan en las Tablas 1 y 2 fueron diseñados con el programa Beacon 5 y sintetizados por Sigma-Aldrich (Reino Unido) e Invitrogen (Argentina).

**Tabla 1. Secuencia de primers para amplificar ADNc por qPCR.**

Gen	Primer forward	Primer reverse	Temperatura de Annealing (°C)
HO-1	5'GAGTGTAAGGACCCATCGGA3'	5'GCCAGCAACAAAGTGCAAG3'	58
Survivina	5'GGAGCCAGATGACGACCCCA3'	5'AGCGCAACCGGACGAATGCT3'	58
Ciclina D1	5'GCGGAGGAGAACAAACAGAT3'	5'TGAGGCGGTAGTAGGACAGG3'	58
Bcl-xL	5'GGTATTGGTGAGTCGGATCG3'	5'TCCACAAAAGTATCCCAGC3'	64
STAT3	5'AGCATCCTGAAGCTGACCCAGGT3'	5'TCGGCAGGTCAATGGTATTGCTGC3'	58
KLK3 (PSA)	5'GTTGTCTTCCTACCCTGTCC3'	5'ACTGCCCTGCCACGAGAG3'	58
uPA	5'GAGATCACTGGCTTTGGAAA3'	5'CCAGCTCACAAATCCAGTCA3'	58
actina $\beta$	5'CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG3'	5'GTGGGCCGCTCTAGGCACCA3'	58
AR	5'GGCATGGTGAGCAGAGTG3'	5'GGGTGGAAAAGTAATAGTCAATGG3'	58

**Tabla 2. Secuencia de primers para amplificar ADN de ChIP por qPCR.**

Gen	Primer forward	Primer reverse	Temperatura de Annealing (°C)
MMP-9	5'CCCTCCCTCCCTTTCATACAGTTC3'	5'GCTTACACCACCTCCTCCTCTC3'	58
Ciclina D1	5'CCCCGCAAGGACCGACTG3	5'AAATTC-CAGCAGCAGCCCAAG3'	58
VEGF-A	5'GGGTTGAGGGCCTTGGAG3'	5'GAGGGAGCAGGAAAAGTGAGG3'	58
uPA	5'TGAGGCAGTCTTAGGCAAGTTGG3'	5'GGCTTGTAATTTCTCCGTGCTTCC3'	58
PSA	5'GCTCTCCCTCCCCTCCACAG3'	5'GGCACCCAGAGGCTGACCAAG3'	58
$\beta$ -globina	5'TTTGCAGCCTCACCTTCTTT3'	5'TGGGGGATATTATGAAGGGC3'	58

#### I.5 Líneas celulares

Se utilizaron cuatro líneas celulares adherentes derivadas de carcinomas de próstata humanos:

**LNCaP:** Esta línea celular proviene de un adenocarcinoma de próstata humano y se aisló de una biopsia de nódulo linfático supraclavicular de un paciente con un diagnóstico confirmado de metástasis de próstata (Horoszewicz et al. 1983). Posee el AR mutado en el codón 877, en

el dominio de unión al ligando y es activado por progesterona y estradiol. Es sensible a andrógenos y expresa PSA.

**PC3:** Esta línea celular fue establecida de una metástasis ósea y proviene de un adenocarcinoma de próstata humano (Kaighn et al. 1979). Es insensible a andrógenos y no expresa PSA. Su perfil de crecimiento en hueso es osteolítico.

**PC3-pcDNA3 y PC3HO-1:** Estas líneas fueron generadas previamente en nuestro laboratorio a partir de la línea PC3 por transfección estable con el vector de expresión para HO-1 y su línea control conteniendo el vector vacío (pcDNA3) (Gueron et al. 2009).

## **I.6 Plásmidos**

El vector de expresión humano pcDNA3HO-1 fue gentilmente proporcionado por el Dr. M. Mayhofer (Clinical Institute for Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Vienna).

El vector PSA-luc es un plásmido reportero (pGL3 Basic) que contiene clonado 4,3 kb del promotor de PSA humano río arriba del TSS del gen de la luciferasa. Dicho plásmido fue generado previamente en nuestro laboratorio (Zalazar 2009).

El vector de expresión humano pcDNA3 AR5 es un plásmido de expresión que contiene clonado el ADNc del AR con una delección del dominio de unión al ligando que lo convierte en una proteína constitutivamente activa. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Guido Jenster (Department of Urology, Josephine Nefkens Institute, Erasmus, The Netherlands).

El vector dominante negativo de STAT3 (STAT3 DN) es un plásmido de expresión del ADNc de STAT3 con una mutación puntual en el codón 705 que reemplaza una Tirosina por una Fenilalanina, de modo que la proteína no puede ser fosforilada y compite con la proteína wild type por la quinasa activadora (Bromberg et al. 1998). El mutante de STAT3 constitutivamente activado (STATC) es un plásmido de expresión del ADNc de STAT3 con dos mutaciones puntuales que sustituyen los aminoácidos A661 y N663 por residuos de Cisteína, permitiendo que la proteína forme dímeros mediante puentes di-sulfuro en ausencia de la fosforilación activadora (Bromberg et al. 1999). Ambos vectores fueron gentilmente provistos por el Dr. James Darnell (Rockefeller University, New York, NY).

Los vectores pSPAX2, pMD2G, pSEW-shSTAT3.1, pSEW-shSTAT3.2 y pSEW-GL2 fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Bernd Groner (Georg Speyer Haus, Institute for Biomedical Research, Frankfurt, Germany). pSPAX2 y pMD2G (Addgene) son plásmidos de

segunda generación para la construcción de partículas lentivirales. El plásmido pSPAX2 codifica para la maquinaria de empaquetamiento viral y el plásmido pMD2G codifica para las proteínas de la envoltura viral. El vector pSEW fue desarrollado a partir del vector lentiviral SEW (derivado del virus de HIV-1) y las secuencias sh fueron introducidas en el 3'UTR de este vector, dado que no existen promotores en esta región, previamente se introdujo un promotor de una histona constitutiva río arriba de los oligos shSTAT3 por clonación en un vector pSUPER-vector (Oligo-Engine) (Demaison et al. 2002). shSTAT3.1 y shSTAT3.2 codifican para dos shRNA diferentes contra STAT3. El vector pSEW-GL2 codifica para el gen de luciferasa.

## **II. METODOS**

### **II.1 Cultivo celular**

#### II.1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

Las líneas celulares LNCaP, PC3, PC3pcDNA3 y PC3HO-1 se mantuvieron en medio RPMI 1640 con antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml) y SFB 10% (v/v). En el caso de las células transfectadas establemente, al medio de cultivo se le adicionó 50 µg/ml de G418. Las células se cultivaron a 37° C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%. Cuando los cultivos alcanzaron un 90% de confluencia se repicaron realizando dos lavados con 5 ml de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM pH = 7,4) y una incubación con 1 ml de tripsina (0,25% en PBS) durante 1-3 min en estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> 5%. El efecto de la tripsina se interrumpió por dilución con medio de cultivo.

#### II.1.2 Preservación criogénica

Cuando los cultivos celulares alcanzaron el 85% de confluencia, las células fueron tripsinizadas como se describió anteriormente, centrifugadas por 5 min a 900 rpm y luego resuspendidas en medio de cultivo con SFB 20% (v/v) y dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v). Las células fueron fraccionadas en alícuotas de a 1 ml en criotubos y colocadas en un dispositivo “cryo-cooler” a -80°C. Luego de 24 h las células fueron transferidas a nitrógeno líquido.

### II.1.3 Tratamientos con hemina, testosterona e IL-6

Los cultivos celulares de PC3 y LNCaP fueron tratados con: hemina, un inductor específico de la actividad y de la expresión de HO-1, con testosterona, IL-6 o la combinación de estos tratamientos.

Para el tratamiento con testosterona, las células LNCaP, se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo fenol (Invitrogen) con el agregado de SFB depletado de hormonas (charcolizado, SFBch) o con el agregado de andrógenos (Undecanoato de testosterona, Shering). Brevemente, se charcolizó el SFB para depletarlo de hormonas según describió (Lippman et al. 2005); 5 ml de una solución de carbono dextrano 10X (1,25 g de carbón activado, Merck; 0,125 g de dextrano, GE; 0,01 M Tris en 50 ml, pH=7,4) se centrifugó a 12000 rpm por 10 min (Sorvall SS-34). Se descartó el sobrenadante y el pellet se diluyó en 50 ml de SFB. La mezcla se incubó 30 min a 56°C y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se mezcló nuevamente con otro pellet de una solución carbono dextrano 10X y se repitió el procedimiento anterior. Finalmente el sobrenadante se lo esterilizó por filtración (0,2 µm). Se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización. El tratamiento con andrógenos consistió en incubar 24 h las células en medio de cultivo con SFBch y luego 24 h con Testosterona (Undecanoato de testosterona, Shering). La solución stock de testosterona (547,4 mM) se diluyó en DMSO a una concentración de 10 mM y a continuación una segunda dilución en medio de cultivo a una concentración de 1000X a fin de obtener una concentración final en el medio de cultivo de 10 µM.

Para realizar el tratamiento con hemina, 36 mg de cloruro de hemina se disolvieron en 0,4 ml de NaOH 0,5 N y se agregaron 0,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH=8, se filtró utilizando filtros de 0,2 µm y se conservó a -80°C (solución stock de hemina 550 µM) (Muppala et al. 2000). Inmediatamente antes de su uso se diluyó en PBS 1:100 y se hizo una dilución para obtener una concentración final de 80 µM en RPMI 1640 (para PC3 o LNCaP). El tratamiento se realizó durante 24 h.

El tratamiento con IL-6 consistió en la administración de IL-6 (Endogen) (solución stock de IL-6 1 ng/µl) durante 24 h o durante 30 min (solo en el caso de las inmunoprecipitaciones con el AR), a una concentración final de 10 ng/ml en RPMI 1640.

Para realizar los tratamientos combinados las células LNCaP fueron incubadas 24 h en RPMI 1640 sin rojo fenol conteniendo 10% de SFBch y luego fueron expuestas durante 24 h a testosterona (10 µM), hemina (80 µM) ambos, y/o IL-6 (10 ng/ml) preparados en RPMI 1640

sin rojo fenol conteniendo 10% de SFBch. Los controles consistieron en medio de cultivo con la adición de los respectivos vehículos.

## **II.2 Preparación de vectores de expresión**

### **II.2.1 Preparación de bacterias competentes**

Se prepararon bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  partiendo de un cultivo de 5 ml de medio completo Luria-Bertani (LB/ peptona o triptona 1% m/V; extracto de levadura 0,5 % m/V y NaCl 1% m/V pH = 7,5) sin antibiótico, crecido durante toda la noche a 37° C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4 a 0,6. Las bacterias fueron centrifugadas a 700 g durante 5 min a 4°C, el pellet se resuspendió en 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril y se incubó durante 15 min en hielo. Luego se centrifugó nuevamente a 700 g durante 5 min a 4°C y el pellet se resuspendió en 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y estéril, se conservó en 15% de glicerol a -70°C.

### **II.2.2 Transformación de bacterias competentes**

Las bacterias competentes (50  $\mu$ l) se transformaron con los plásmidos deseados (1  $\mu$ g) con resistencia a ampicilina, incubando durante 30 min en hielo y luego realizando un shock térmico (a 42°C durante 2 min y posteriormente 5 min en hielo) para permeabilizar la pared bacteriana. Se agregaron 450  $\mu$ l de LB sin antibiótico y se incubó durante 1 h a 37°C. Una alícuota (200  $\mu$ l), se rastrilló en una placa con LB + ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y se incubó toda la noche en estufa a 37°C. Se picó una colonia y se la dejó crecer en medio LB + ampicilina. Se guardó un stock en glicerol 15%, a -70°C.

### **II.2.3 Aislamiento del ADN plasmídico**

Se realizó un cultivo en medio LB líquido con ampicilina tomando las bacterias transformadas con el plásmido de interés e incubándolo 16 h a 37°C con agitación orbital. Luego se centrifugó a 6.000 g durante 15 min a 4°C. El pellet se resuspendió en P1 (Tris base 0,606 % m/V; Na<sub>2</sub>-EDTA-2H<sub>2</sub>O 0,372% m/V, pH=8; 50  $\mu$ g/ml de RNasa A) para lisar las bacterias. Se agregó P2 (NaOH 0,8% m/V; SDS 20%) durante 5 min para desnaturalizar el ADN y luego P3 (acetato de potasio 29,45% m/V, pH=5,5) para renaturalizarlo. Este método se basa en que debido a las diferencias de tamaño del ADN cromosómico y del plasmídico,

éste último de menor tamaño, será el único capaz de renaturalizar. Por lo tanto, se incubó en hielo durante 20 min para favorecer su renaturalización y se procedió a centrifugar a 20.000 g, durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante 15 min y luego se precipitó el ADN con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 15.000 g durante 30 min a 4°C. El pellet se lavó con etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 15.000 g durante 10 min a 4°C. Se dejó secar y el pellet se redisolvió en buffer TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH=8). El plásmido aislado se cuantificó por medición de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant Pro).

## **II.3 Ensayo de genes reporteros**

### II.3.1 Transfección de células para ensayo de gen reportero

Para realizar la transfección por el método de lipofectamina, las células PC3 o LNCaP se crecieron en placas de 12 pocillos hasta una confluencia del 90%. En caso de requerir posterior tratamiento con testosterona, las células fueron incubadas con RPMI sin rojo fenol con 10% de SFBch durante 24 h previamente a la transfección. Luego, se diluyeron 2 µl de lipofectamina 2000 en un volumen de 50 µl de medio RPMI sin antibióticos ni SFB. En paralelo, se diluyeron 2 µg de plásmido reportero y, en los casos que fueron necesarios, 2 µg de cada plásmido de expresión, en 50 µl de medio RPMI sin antibióticos ni SFB. Ambas mezclas se incubaron 5 min a temperatura ambiente, luego se mezclaron y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS y luego se les agregó 300 µl de medio RPMI (sin antibióticos ni SFB) por pocillo. Finalizada la incubación se agregaron 100 µl de la mezcla lipofectamina 2000/plásmidos gota a gota a cada pocillo y se incubó durante 5 h en estufa a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%. Transcurrido ese período, se reemplazó la solución con medio fresco o en caso de realizar tratamientos, los mismos fueron incorporados en este paso. Luego de 24 h post-transfección, las células se cosecharon.

### II.3.2 Ensayo de la actividad de la luciferasa

Se midió la actividad de luciferasa utilizando el reactivo Steady Glo Luciferase System (Promega) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 1ml de PBS, se lisaron por incubación durante 15 min a temperatura ambiente en

oscuridad con 40  $\mu$ l de RPMI sin rojo fenol y 40  $\mu$ l de reactivo de luciferasa (Promega). La actividad de luciferasa se determinó en 20  $\mu$ l de cada lisado en el luminómetro Glomax Multidetecion System (Promega). Los datos se normalizaron con la concentración de proteínas totales realizada por el método colorimétrico de Bradford. Para la normalización de los resultados no se utilizaron métodos que consideren controles internos de transfección, como Renilla o actividad de  $\beta$ -galactosidasa, ya que cuando se usan otros reporteros como control interno estos pueden competir cuando se realiza un tratamiento con agentes genotóxicos u hormonas (Sims et al. 2003; Mulholland et al. 2004; Thavathiru y Das 2001). En nuestra experiencia, la mejor manera de normalizar los datos con este tipo de tratamientos es con los valores de proteínas totales, realizando siempre triplicados de transfección y repitiendo cada experimento por lo menos tres veces.

#### **II.4 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

Para la determinación del porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular por citometría de flujo, las células ( $5 \times 10^5$ ) se sembraron en placas de 100 mm de diámetro. Se prestó particular atención a que la confluencia no supere el 50% en el momento de la cosecha. Finalizados los tratamientos, las células se cosecharon por tripsinización y luego de un lavado con 2 ml de PBS, se fijaron en etanol 70% durante toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$ . Para esto las células se resuspendieron en 1,5 ml de PBS y se agregaron 3,5 ml de etanol 96% en pulsos de 700  $\mu$ l con agitación suave en vortex. Luego de lavar con 5 ml de PBS, se realizó la marcación con yoduro de propidio resuspendiendo el pellet celular en 500  $\mu$ l de PBS con 50  $\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio y 120  $\mu\text{g/ml}$  de RNAsa A e incubando 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . La distribución del ciclo celular se analizó en el citómetro de flujo BD FACS ARIA II. Se empleó un programa para histogramas de deconvolución de la frecuencia del contenido de ADN (Cyflogic 1.2.1 software, CyFlo Ltd.) y se graficó el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

#### **II.5 Análisis de la expresión génica a nivel transcripcional.**

##### **II.5.1 Transfección de células para obtención de ARN**

Para la transfección por el método de lipofectamina, las células se crecieron en placas de 60 mm de diámetro hasta un 70% de confluencia. En caso de requerir posterior tratamiento con testosterona, las células fueron incubadas con RPMI sin rojo fenol, con 10% de SFBch, durante 24 h previamente a la transfección. Se diluyeron 2 µg de cada plásmido de expresión en 50 µl de medio RPMI 1640 sin antibióticos ni SFB y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. En paralelo, 5 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) se incubaron en 50 µl de medio RPMI sin antibióticos ni SFB durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se mezclaron ambas soluciones e incubaron 20 min a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS y se les agregó 700 µl de RPMI 1640 sin antibióticos ni SFB. Los 100 µl de la mezcla plásmido/Lipofectamina 2000 fueron añadidos gota a gota a las células que fueron incubadas 5 h en estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se reemplazó el medio de incubación con 5 ml de medio fresco RPMI 1640 con SFB 10% y antibióticos o en caso de realizar tratamientos, los mismos fueron incorporados en este paso. Luego de 24 h post-transfección, las células se cosecharon.

### II.5.2 Transducción de células

La expresión de STAT3 se silenció utilizando vectores lentivirales en células HEK293. Para el empaquetamiento lentiviral, las células HEK293LTV se transfectaron por el método de PEI (Polyethyleneimine, poliamina, Sigma-Aldrich). Para ello, 3,64 µg de pSPAX2, 1,45 µg de pMD2G y 2,43 µg de shRNA STAT3.1 más 2,43 µg de shRNA STAT3.2 o reemplazando los vectores shRNA por 4,86 µg de pSEW-GL2 como control, se mezclaron con 22 µg de PEI en 3 ml de medio RPMI 1640 sin antibióticos ni SFB y se incubaron durante 8 min a temperatura ambiente. Las células HEK293LTV crecidas en placas de 100 mm de diámetro hasta un 90% de confluencia se lavaron dos veces con PBS y se les agregó 7 ml de RPMI 1640 sin antibióticos suplementado con 2% de SFB. Los 3 ml de la mezcla plásmido/PEI se añadieron gota a gota a las células que se incubaron 5 h en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%. Luego el medio de cultivo se reemplazó por 10 ml de RPMI 1640 con 10% de SFB y antibióticos. El sobrenadante viral se colectó cada 24 h cuatro veces consecutivas. Finalmente, se transducieron las células LNCaP previamente crecidas en placas de petri (60 mm) en un 80% de confluencia, con los sobrenadantes lentivirales filtrados y suplementados con 8 µg/ml de polybrene (Millipore) cada 24 h por cuatro rondas consecutivas. Luego de 48 h post-transducción las células se cosecharon para extracción de proteínas totales o ARN. En caso de realizarse tratamientos con testosterona, luego de 24 h de la última ronda de transducción las



células fueron incubadas con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFBch durante 24 h, posteriormente el medio fue reemplazado por los tratamientos durante 24 h adicionales, cosechando las células a las 48 h post-transducción.

### II.5.3 Aislamiento del ARN

Para el aislamiento del ARN se utilizó el reactivo Tri-Reagent (Genbiotech) como lo detalla el fabricante con algunas modificaciones. Las células se crecieron en placas de Petri de 100 mm o 60 mm y se realizaron los tratamientos correspondientes de acuerdo a cada experimento. Al momento de cosechar las células se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 4 ml de PBS. Luego, se colectaron las células utilizando un scraper con 500  $\mu$ l de Tri-Reagent y la suspensión celular se homogeneizó completamente por pipeteo con tip de p1000 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló enérgicamente con vortex durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Para acelerar la separación de fases se centrifugó a 12.000 rpm, a 4°C durante 15 min conservando la fase acuosa que contiene el ARN. El ARN se precipitó con 250  $\mu$ l de isopropanol por cada 500  $\mu$ l de Tri-Reagent incubando a -20°C durante 30-40 min. Se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1ml de etanol 75%. Se centrifugó a 7.500 rpm a 4°C durante 5 min y se removió el sobrenadante. Para eliminar las trazas remanentes de etanol, el pellet se secó a 50°C durante 3 min, se resuspendió en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y se rehidrató incubando 10 min a 55-60°C. El ARN extraído se conservó a -70°C, o bien, se utilizó en reacciones de transcripción reversa.

### II.5.4 Cuantificación y pureza del ARN

La concentración del ARN obtenido se midió realizando una dilución de la muestra 1:140 con H<sub>2</sub>O y midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant Pro). El grado de pureza de la muestra se estimó como la razón entre A<sub>260</sub> nm/A<sub>280</sub> nm. Si la concentración del ARN era mayor a 1  $\mu$ g/ $\mu$ l con una pureza mayor a 1,7 se procedió a la retro-transcripción para la obtención del ADNc.

### II.5.5 RT-PCR

El ADNc (ADN copia) se sintetizó a partir del ARN total mediante transcripción reversa o retrotranscripción (RT) utilizando el kit RevertAid RT (Fermentas) de acuerdo a las

instrucciones del fabricante. Para eso, se preparó una mezcla de reacción de acuerdo a la tabla 3.

**Tabla 3. Protocolo para la retrotranscripción**

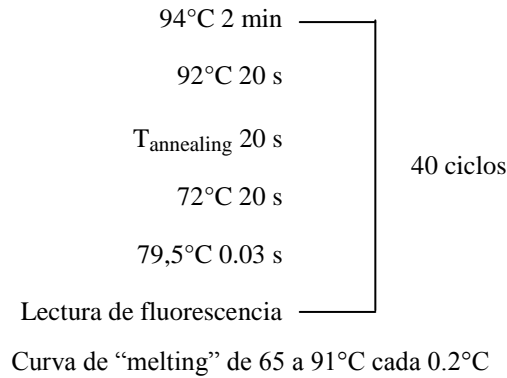
Reactivo	Volumen	Concentración Final
ARN	2µg (volumen variable)	0,1µg/µl
Oligo dT 0,5 µg/µl	1 µl	0,025 µg/µl
H2O DEPC	Cantidad necesaria	-
	5 min a 65°C	
Buffer 5X	4 µl	1X
Inhibidores de RNAsa 20 U/µl	1 µl	1U/µl
dNTP 10mM	2 µl	0,5 mM
RevertAid RT 200 U/µl	1µl	10 U/µl
Volumen Final	20 µl	
	60 min a 42°C	
	5 min a 70°C	

Se mezclaron el ARN con el Oligo dT y el agua libre de RNAsas y se desnaturalizaron las muestras a 65°C durante 5 min. Luego se le agregó la mezcla de reacción conteniendo el buffer de reacción, dNTPs, inhibidores de RNAsas y transcriptasa reversa, tal como se indica en la tabla y se incubó durante 60 min a 42°C. La reacción se inactivó a 70°C durante 5 min. El ADNc obtenido se utilizó en reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) o se conservó a -20°C. Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la Tabla 1.

#### II.5.6 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ADNc se amplificó por qPCR utilizando el kit de Taq ADN Polimerasa (Fermentas). Dos microlitros de una dilución 1:20 del ADNc obtenidos en la RT, se amplificaron en una mezcla de reacción con buffer de reacción (1X); MgCl<sub>2</sub> (2 mM); oligos específicos (0,4 µM); dNTPs (0,2 mM); 0,025 µl de SYBRgreen y 0,03 U/µl de Taq ADN polimerasa recombinante (Fermentas) en un volumen final de 25 µl. Los primers utilizados se encuentran en la Tabla 1.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un aparato DNA Engine Opticon (MJ Research). El programa de amplificación se detalla a continuación:



Cada reacción de qPCR se realizó por duplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Opticon 3 trazando una recta en la parte exponencial de la curva de amplificación y obteniendo así los valores de  $C_T$ . El cálculo de la inducción de la expresión de los genes analizados se basa en el método del  $\Delta\Delta C_T$  (Current Protocols in Molecular Biology). Se estimó el promedio de los valores de  $C_T$  para el gen incógnita y para el NoRT (ARN que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retro-transcriptasa) de la siguiente manera:

$$C_T = (C_{T1} + C_{T2})/2 \quad (1)$$

La diferencia en los valores de  $C_T$  entre cada muestra y el No RT determina el delta- $C_T$  ( $\Delta C_T$ ). Esto se resume en la siguiente expresión:

$$\Delta C_T = (C_T^{\text{NoRT}}) - (C_T^{\text{muestra}}) \quad (2)$$

Una vez normalizado y debido al exponente natural de qPCR, los valores son transformados a medidas relativas de veces de inducción ( $VI_a$ ) para una mejor comparación entre los experimentos:

$$VI_a = 2^{\Delta C_T} \quad (3)$$

Luego, se normalizaron nuevamente los niveles de ADNc de las muestras con su correspondiente control de carga (Actina) de la siguiente manera:

$$VI_b = VI_a^{\text{muestra}} / VI_a^{\text{actina}} \quad (4)$$

Donde  $VI_b$  representa las veces de inducción normalizada a Actina. Finalmente, los datos se normalizaron respecto al control ( $VI_n$ ).

$$V_{In} = V_{I_b \text{ muestra}} / V_{I_b \text{ control}} \quad (5)$$

Para el cálculo de errores de cada medición se obtuvo el desvío estándar (ds) de las mediciones del  $C_T$  de las muestras tratadas y no tratadas del gen y del control de Actina de los datos obtenidos para cada tratamiento:

$$ds = \sqrt{\frac{\sum(C_T + \bar{C}_T)^2}{n-1}} \quad (6)$$

Donde n es el tamaño de la muestra.

Luego, el error se calculó como la raíz cuadrada de la suma de los errores de los  $C_T$  de las muestras, de los  $C_T$  de los No RT y de los  $C_T$  de Actina (Smith et al. 2004), aplicando la siguiente fórmula:

$$E = [(ds/ C_T)^2 \text{ muestra} + (ds/ C_T)^2 \text{ noRT} + (ds/ C_T)^2 \text{ actina}]^{1/2} \quad (7)$$

y estos datos se multiplicaron por las veces de inducción finales.

### II.5.7 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

#### Crosslink

Las células se crecieron en placas de Petri de 100 mm a una confluencia del 80% y se trataron de la forma descrita previamente en esta sección. Luego del tratamiento se realizó un crosslink de las proteínas y el ADN con 1% de formaldehído con agitación durante 10 min en hielo, partiendo de 6-8 placas de 100 mm por cada tratamiento en un volumen de 5 ml de medio de cultivo. Las células se incubaron con glicina 125 mM para detener el crosslink durante 15 min con agitación en hielo. El medio se descartó y se lavó con 3 ml de PBS frío con inhibidores de proteasas y fosfatasa (NaF 0,375  $\mu$ M y PMSF 0,5 mM). Luego, se removieron las células de la placa con 600  $\mu$ l del mismo PBS utilizando una espátula y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml para ser centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS y se contó el número de células. Posteriormente se dividieron en tubos conteniendo 7,5 x 10<sup>6</sup> células en un volumen final de 500  $\mu$ l resuspendidas en buffer de lisis (125  $\mu$ l de Tris pH=7,4, 250  $\mu$ l de SDS 10%, 12,5  $\mu$ l IP, para 2.5 ml). El ADN se fragmentó utilizando el sonicador de baño Bioruptor TMUCD-200. El sonicado se realizó en tubos de 15 ml conteniendo 500  $\mu$ l de cada lisado (7,5x10<sup>6</sup> células) a potencia H

(high) durante 10 min con intervalos de 30 s (30 s prendido – 30 s apagado), a los efectos de lograr un enriquecimiento del ADN en fragmentos de 300 pb (con fragmentos entre 500 pb y 200 pb). El tamaño de los fragmentos de ADN se chequeó por electroforesis en geles de agarosa 1% como se indica más adelante. Finalmente se centrifugó a 12.500 rpm, durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se lo utilizó para realizar la inmunoprecipitación de cromatina.

#### Electroforesis en gel de agarosa

Previamente a la inmunoprecipitación, se chequeó la fragmentación del ADN a partir de 30 µl de los lisados que fueron sometidos al crosslink. La extracción de ADN se realizó por el método de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1), como se detalla más adelante. En una cuba de electroforesis horizontal (Wide Mini-Sub GT, BioRad) se armó un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (0,01 µg/ml) en buffer de electroforesis TAE (Tris- Acetato 40mM pH=8; EDTA 1 mM). Se sembraron 12 µl de muestra conteniendo 2 µl de buffer de siembra (glicerol 50%; EDTA 50 mM pH=8; SDS 10%; orange G 0,2% m/V) y 2 µl de un marcador de peso molecular de 100 pb (Productos Bio-Lógicos) y 2 ml de un marcador de 1 kb (Productos Bio-Lógicos). La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min, utilizando una fuente de poder PowerPac Basic (BioRad). La corrida se visualizó y fotografió en un transiluminador de luz UV (G:Box, Syngene).

#### Inmunoprecipitación

Para realizar el ChIP se mezclaron 200 µl ( $2 \times 10^6$  células) de los lisados que se habían sometido al crosslink y 12 µg del anticuerpo específico contra HO-1 (Stressgen). Como control de especificidad se armaron tubos con un anticuerpo no específico IgG (12 µg) o GAL4 (0,5 µg) para cada muestra. Todos los tubos se suplementaron con inhibidores de proteasas MPI (Sigma). Los tubos se incubaron 16 h con agitación rotatoria a 4°C. Simultáneamente, se bloquearon las beads o esferas de agarosa (Proteína G-Sepharose, Invitrogen). Para ello, previamente se lavaron 500 µl de beads tres veces con 1 ml de buffer IP (Tris 50 mM pH=7,4; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM pH=8; NP40 0,5%; Triton X-100 1% e inhibidores de proteasas MPI (Sigma)) y se centrifugaron 3 min a 2.000 rpm. Luego, se resuspendieron en un volumen final de 500 µl de buffer IP con inhibidores de proteasas, BSA (2 mg/ml), ADN de esperma de salmón (1 mg/ml) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron cinco veces las beads con 1 ml de buffer IP y centrifugando 3 min a 2.000 rpm. Finalmente el pellet se resuspendió con 500 µl de buffer IP con inhibidores de proteasas. A continuación, se agregaron 50 µl de beads bloqueadas a cada inmunoprecipitación

y se incubó 16 h a 4°C con rotación. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 1 ml de buffer IP conteniendo NaCl (500 mM), se mezcló diez veces por inversión y se centrifugó a 2.000 rpm durante 3 min a 4°C. Luego se realizaron tres lavados con 1 ml de buffer IP y posteriormente, se realizó un lavado con 1 ml de buffer TE (pH=8). Las beads se resuspendieron en 300 µl de buffer TE y el crosslink se revirtió incubándolas durante 16 h con 0,5% de SDS y 0,2 mg/ml de proteinasa K (Invitrogen) a 65°C. De la misma manera se revirtió el crosslink de 20 µl de muestra sin inmunoprecipitar para utilizarlo como input. La extracción del ADN del ChIP se realizó por el método de Fenol:Cloroformo:Isoamílico. En primer lugar se precipitaron las beads dos veces centrifugado a 2.000 rpm, durante 3 min conservando el sobrenadante que contiene el ADN del ChIP. Para aislar el ADN se realizaron dos extracciones con 1 volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1) mezclando con vortex durante 30 s y centrifugando a 12.500 rpm 10 min a 4°C. Con la fase acuosa obtenida se realizó una nueva extracción con 1 volumen de cloroformo. Nuevamente se centrifugó a 12.500 rpm, a 4°C durante 10 min y se conservó la fase acuosa. El ADN se precipitó con dos volúmenes y medio de isopropanol y acetato de sodio pH=5,2 a una concentración final de 150 mM mezclando por inversión 4-6 veces e incubando durante 2 h a -80°C. Luego de centrifugar (12.500 rpm, 15 min), el pellet se lavó con el agregado de 500 µl de Etanol 70%, centrifugando nuevamente (12.500 rpm, 5 min). El ADN obtenido se secó en bloque térmico a 65°C y se resuspendió en 200 µl de agua libre de nucleasas conservándose a -20°C. Finalmente las muestras de ADN del ChIP y de los input se amplificaron por qPCR como se detalla a continuación.

#### Amplificación del ADN del ChIP

La amplificación se llevó a cabo por qPCR. Se amplificaron 12 µl del ADN del ChIP en una mezcla con buffer de reacción (1X); MgCl<sub>2</sub> (2 mM); primers específicos (0,4 µM); dNTPs (0,2 mM); 0,025 µl de SYBRgreen y 0,03 U/l de Taq DNA polymerase recombinante (Fermentas) en un volumen final de 25 µl. La reacción de qPCR se llevó a cabo en un aparato ADN Engine Opticon (MJ Research) utilizando el programa de amplificación que se detalla en la sección anterior. Los primers utilizados para amplificar cada uno de los genes de interés se indican en la tabla 2.

Para cada experimento se realizaron al menos dos réplicas biológicas y cada muestra se amplificó por duplicado. La normalización de los valores se realizó al control “input” y al control inespecífico (IgG no específico o anti-GAL4). Se representó como veces de enriquecimiento. Esta metodología se basa en el método del  $\Delta\Delta\text{CT}$  modificado (Devore

2007{Livak, 2001 #2935) and Weisstein (<http://mathworldwolframcom/ErrorPropagationhtml>).

Para la normalización con el input y con el control inespecífico, se calculó el promedio de los valores de  $C_T$  como se describió anteriormente en la fórmula (1). Cada experimento y muestra de IgG se normalizó a la señal obtenida de un input de la muestra control; esta representa el valor de  $\Delta C_T$  indicado en la siguiente fórmula:

$$\Delta C_{T \text{ no esp}} = \overline{C_T}_{\text{input}} - \overline{C_T}_{\text{no esp}}$$

$$\Delta C_{T \text{ esp}} = \overline{C_T}_{\text{input}} - \overline{C_T}_{\text{esp}} \quad (8)$$

Donde “no esp.” es el ChIP realizado con el anticuerpo no específico (anti-IgG o anti-GAL4) y “esp.” es el ChIP realizado con el anticuerpo específico. Luego, se calculó el  $\Delta\Delta C_T$  que representa la relación entre la cantidad de ADN inmunoprecipitado con anticuerpo específico y la cantidad de ADN inmunoprecipitada con anticuerpo no específico:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ no esp}} - \Delta C_{T \text{ esp}} \quad (9)$$

Dado el carácter exponencial de la PCR, los valores de  $\Delta\Delta C_T$  fueron transformados a medidas relativas de veces de enriquecimiento (VE) para una mejor comparación entre los experimentos:

$$VE = 2^{\Delta\Delta C_T} \quad (10)$$

La propagación del error se realizó utilizando la fórmula (7) arriba mencionada. Donde en lugar de actina se utilizó la muestra input y en lugar de No RT se utilizó el IgG. En el caso del enriquecimiento normalizado con el porcentaje de input, los valores de  $C_T$  para cada muestra fueron promediados, y se normalizó con la señal obtenida en el input de la muestra correspondiente, como se indicó en (8). Los valores así obtenidos fueron transformados a veces de enriquecimiento de acuerdo a la fórmula:

$$VE = 2^{C_T} \quad (11)$$

## II.6 Análisis de proteínas

### II.6.1 Preparación de lisados celulares

#### Extractos proteicos totales

Las células tratadas, se lavaron dos veces con PBS en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 10 mM y NaF 0.5  $\mu$ M) y se cosecharon con el agregado de 120  $\mu$ l de PBS e inhibidores. Luego se centrifugó a 3.000 rpm durante 1 min a 4°C y el pellet celular se resuspendió en buffer RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) (Tris-HCl 50 mM pH=7,4; NaCl 150 mM; EDTA 20 mM; pH=8; deoxicolato de sodio 1% (p/v); azida de sodio 0,02%, SDS 0,1% (p/v); Tritón X-100 1%) o en buffer de inmunoprecipitación (en caso de los lisados para inmunoprecipitación) (Tris-HCl 20 mM pH=8, NaCl 137 mM, glicerol 10%, EDTA 2 mM, Triton X-100 1%) con inhibidores de fosfatasa (NaF 0,5  $\mu$ M;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  8 mM) e inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA). Se incubó en hielo durante 20 min y se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 4 min. El sobrenadante conteniendo las proteínas totales se conservó a -20°C.

#### Fraccionamiento núcleo-citoplasma

Las células tratadas, se lavaron dos veces con PBS en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 10 mM y NaF 0.5  $\mu$ M) y se cosecharon con el agregado de 120  $\mu$ l de PBS e inhibidores. Luego se centrifugó a 3.000 rpm durante 1 min a 4°C y el pellet celular se resuspendió en 200  $\mu$ l de solución "A" de baja concentración de sales (HEPES 50 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 100  $\mu$ g/ml,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, NaF 20 mM, pH=7,9 e inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA)), se agitó utilizando vortex y se resuspendió el pellet con tip de p200. Las células se incubaron en hielo 10-15 min para permitir que se hinchen. Se agregaron 12,5  $\mu$ l de una solución 10% de Nonidet NP-40 y se agitaron vigorosamente por 10 s. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 rpm, por 30 s a 4°C. El sobrenadante (extracto citoplasmático) se colectó, se almacenó a -80°C inmediatamente hasta el momento del uso. Al pellet nuclear se le agregó 50  $\mu$ l de solución "A", y se resuspendió suavemente. Se centrifugó a 12.000 rpm por 30 s y se descartó el sobrenadante. Los núcleos fueron lisados agregando al pellet lentamente 50  $\mu$ l de solución "C", alta en concentración de sales (HEPES 50 mM, KCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 100  $\mu$ g/ml,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, NaF 20 mM, pH=7,9, glicerol 10% e inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA)). Se homogeneizó con tip, se agitó vigorosamente por 20 min a 4 °C y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. Se



colectó el sobrenadante (extracto nuclear) en tubos Eppendorf enfriados. Se tomó una alícuota para medir proteínas y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### II.6.2 Medición de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración proteica usando el método del ácido bicinonínico (BCA 98% y  $\text{CuSO}_4$  2%). La curva estándar se realizó utilizando cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) disuelta en buffer de lisis RIPA. Las muestras (10  $\mu\text{l}$ ) se colocaron en una placa de 96 pocillos que contenía 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{CuSO}_4$ /BCA. Se incubó durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas de ELISA (Glomax Multidetection System, Promega).

### II.6.3 SDS-PAGE y Western blot

#### Preparación de las muestras

Las proteínas aisladas de los lisados celulares fueron diluídas a la concentración deseada (50  $\mu\text{g}$  para extractos totales, 50  $\mu\text{g}$  para extractos citoplasmáticos y 20  $\mu\text{g}$  para extractos nucleares) con buffer de siembra en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  (Tris-HCl 10 mM, pH=8; SDS 1%; Glicerol 4%; sacarosa 0,146 M y azul de bromofenol; DTT 10 mM ó  $\beta$ -mercaptoetanol 1%) y buffer de lisis. Luego las muestras se calentaron durante 5 min a  $100^{\circ}\text{C}$ .

#### Electroforesis

Las muestras fueron preparadas como se describió anteriormente y se sembraron 30  $\mu\text{l}$  de cada una por pocillo. Adicionalmente se sembró en otro pocillo el marcador de peso molecular (Rainbow Marker (Amersham GE)). Se utilizó el sistema vertical de Bio-Rad. Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturalizantes a 120V, durante 1:30 h en presencia de buffer de electroforesis 1X (25 mM Tris; 192 mM Glicina; SDS 0,1%).

#### Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso un filtro de nitrocelulosa (Hybond, Amersham Pharmacia). Una de las caras del gel fue apoyada sobre un trozo de nitrocelulosa del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3M previamente humedecidos en buffer de transferencia (Towbin) 1X (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 3,5 mM; pH=8,3 y metanol 20% (v/v)) y éstos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de

un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en el tanque electroforético, con buffer de transferencia 1X, con el filtro de nitrocelulosa del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 250 mA, durante 90 min. Se verificó que la transferencia fuese exitosa tiñendo las membranas con rojo Ponceau (0,1% Rojo Ponceau, 5% ácido acético). La decoloración de la membrana se llevó a cabo lavando varias veces con buffer TBS-T (NaCl 150 mM; KCl 2,68 mM; Tris base 24,7 mM; Tween-20 0,05% (v/v); pH=7,4).

#### Inmunodetección de proteínas

Para realizar la detección de las proteínas en primer lugar se bloquearon las proteínas inespecíficas con TBS-T (Tween-20 0,05% (v/v) en 10 mM Tris-HCl; pH=7.4) con 5% (p/v) de leche en polvo durante 60 min. Luego las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron durante toda la noche a 4°C, con agitación suave, con los diferentes anticuerpos primarios diluidos en TBS-T. Después de realizar 3 lavados de 15 min con TBS-T con agitación suave, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-conejo (1:5.000) o anti-ratón (1:5.000), según el anticuerpo primario utilizado, acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) y diluidos en TBS-T, durante 2 h, a 4°C, con agitación suave. Luego las membranas se lavaron con TBS-T. Para visualizar las proteínas se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La visualización de las bandas se realizó con el analizador de imágenes Phosphoimager (Fuji Photo Film Co. Ld., Cypress, CA). Las bandas se cuantificaron densitométricamente utilizando el programa NIH ImageQuant y los resultados de normalizaron con Actina  $\beta$ .

#### II.6.4 Co-inmunoprecipitación

Para realizar el ensayo se diluyeron 500  $\mu$ g de proteínas de los lisados celulares y 8  $\mu$ g del anticuerpo específico contra HO-1, 1  $\mu$ g del anticuerpo específico contra AR o 1  $\mu$ g de anticuerpo específico contra STAT3 en un volumen final de 500  $\mu$ l en buffer de inmunoprecipitación. Como control de especificidad se armaron tubos con un anticuerpo no específico IgG (10  $\mu$ g) o GAL4 (0,5  $\mu$ g) para cada muestra. Todos los tubos se suplementaron con inhibidores de proteasas MPI (Sigma). Los tubos se incubaron 16 h con agitación rotatoria a 4°C. Simultáneamente 250  $\mu$ l de beads (Proteína G-Sepharose, Invitrogen) fueron lavados tres veces con 1 ml de buffer de inmunoprecipitación y se centrifugaron 3 min a 2.000 rpm. Luego, se resuspendieron en un volumen final de 500  $\mu$ l de buffer de inmunoprecipitación con inhibidores de proteasas. A continuación, se agregaron 20  $\mu$ l de beads a cada tubo de

inmunoprecipitación y se incubó 16 h a 4°C con rotación. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 1 ml de buffer de inmunoprecipitación y se centrifugó a 2.000 rpm, durante 3 min a 4°C después de cada lavado. Finalmente las beads se resuspendieron en 4 µl de buffer de siembra y 16 µl de buffer de inmunoprecipitación y las muestras se calentaron durante 5 min a 100°C. Se usaron 50 µg del lisado proteico como input. Los inmunocomplejos se analizaron por SDS-PAGE. Todos los experimentos se repitieron tres veces independientes.

### II.6.5 Inmunofluorescencia e inmunocitoquímica

#### Inmunocitoquímica.

Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  por pocillo, sobre cubreobjetos durante toda la noche. Las células tratadas como se describió anteriormente, fueron fijadas en metanol frío, se lavaron con PBS-T (3 x 100 µl/pocillo), y se permeabilizaron con Triton X-100 0,2% en PBS por 10 min. Se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 vol) 7% en PBS por 15 min (para bloquear las peroxidasas endógenas). Luego de los lavados con PBS-T se bloquearon con BSA 2% en PBS-T por 20 min. La incubación con el anticuerpo primario STAT3 (sc-7179, SantaCruz Biotechnology) (1:400) o p65 (R1487P, Acris) (1:400) se realizó por 1 h a temperatura ambiente. La exposición al segundo anticuerpo IgG biotinilado anti-conejo (DAKO LSAB+Kit, HRP) fue por 30 min y por último se realizó una incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO LSAB+Kit, HRP) por 30 min. La reacción de peroxidasa con 3,3'-diaminobenzidina (DAKO LSAB+Kit, HRP) como cromógeno se realizó bajo microscopio invertido, mostrando un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. Las células incubadas sin el anticuerpo primario fueron usadas como controles negativos de marcación. El montaje se realizó con medio de montaje hidrofílico. Para el análisis cuantitativo el área celular fue segmentada en cada imagen (cinco secciones de cada grupo), se determinó la intensidad media y se consideró la diferencia entre este valor y el fondo. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. El valor P fue estimado usando el Test t de Student (dos colas).

#### Inmunofluorescencia y microscopía.

Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  por pocillo, sobre cubreobjetos durante toda la noche. Las células fueron fijadas en metanol frío y permeabilizadas durante 10 min con 0,5% Triton X-100/ PBS, lavadas con PBS, y luego bloqueadas con 5% de BSA/PBS. Las células fueron incubadas durante toda la noche con los anticuerpos primarios descritos en la tabla 4, diluidos en 4% BSA / 0,1% Tween 20/PBS

(solución de incubación). Posteriormente las células se lavaron con PBS e incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a diversos fluoróforos. Los controles negativos fueron realizados reemplazando los anticuerpos primarios por la solución de incubación. Luego de los correspondientes lavados y el montaje, las muestras fueron analizadas por microscopía laser de escaneo confocal utilizando un microscopio Olympus Fluo view FV 1000 y un objetivo de inmersión en agua Olympus 60×/1.20 NA UPLAN APO. Los filtros de excitación y emisión usados fueron los siguientes: excitación Alexa Fluor 488: 488 nm; emisión: filtro pasa banda 505-525 nm; excitación Alexa Fluor 555: 543 nm; emisión: filtro pasa banda 560-620 nm. La microscopía de campo amplio o fluorescencia fue llevada a cabo usando un microscopio Olympus IX71 con objetivo de inmersión en agua 40× /1.15 NA, una lámpara de excitación de mercurio y filtros adecuados (camara: Hamamatsu Orca CCD C4742-95).

**Tabla 4. Anticuerpos para inmunofluorescencia**

Anticuerpo	Dilución
Anti-STAT3 (sc-7179) desarrollado en conejo	1:200
Anti HO-1 (SPA896) desarrollado en conejo	1:200
Anti HO-1 (OSA-110) desarrollado en ratón	1:100
Anti p65 (R1487P) desarrollado en conejo	1:200
Anti AR (sc-7305) desarrollado en ratón	1:200

Procesamiento de imágenes.

Las imágenes de microscopía confocal y de campo amplio fueron procesadas para su presentación con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov>, National Institutes of Health). En las imágenes de fluorescencia se restó el fondo de cada canal (medido en un área sin células) y en algunos casos se aplicó un filtro (de mediana, de radio igual a 1 píxel) solo con fines de presentación. Los análisis de co-localización se realizaron luego de restar el fondo y de segmentar cada célula manualmente. Se utilizó el plug-in de ImageJ de correlación de intensidad para calcular el coeficiente de Manders. El producto de la diferencia de las medias (PDM) y los gráficos de frecuencia de dispersión fueron realizados también mediante el mismo plug-in de ImageJ. Se analizaron 14 a 26 células para cada tratamiento. La translocación de STAT3 fue analizada cuantificando las imágenes de microscopía creando una rutina en Matlab como se indica a continuación.

Segmentación (núcleo, citoplasma).

Se restó el fondo de cada canal (mediana). La segmentación fue realizada manualmente para cada célula usando las imágenes verdes de HO-1 o mediante el contorno celular en microscopio de contraste de fase. Tras la segmentación, el núcleo fue definido como los píxeles donde la señal de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (azul) era mayor a 60 cuentas. Esta segmentación llevó a la creación de dos máscaras: célula y núcleo.

Estimación de la distribución intracelular de STAT3.

Los píxeles en “núcleo” y “célula” fueron sumados para el canal rojo (STAT3). Así se obtuvo la medida “STAT3 total” (STAT3t) y “STAT3 nuclear” (STAT3n). Para estimar la distribución intracelular de STAT3, se calculó el cociente STAT3n/STAT3t. Esta calibración interna fue elegida para eliminar la influencia de la ganancia de amplificación y el factor de zoom para cada condición de adquisición de la imagen.

## **II.7 Muestras de tumores de líneas de cáncer de próstata humano creciendo como xenotransplantes en ratones nu/nu**

### **II.7.1 Histología e inmunohistoquímica**

Los tumores subcutáneos previamente generados (Gueron et al. 2009) y fijados fueron utilizados para inmunohistoquímica. Para ello se utilizó el sistema del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa (LSAB ® + kit, HRP, DAKO). Brevemente, los cortes fueron desparafinados con xileno e hidratados con etanol en concentraciones decrecientes y con agua destilada. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) durante 10 min. Se realizaron varios lavados con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 2% (p/v) en PBS durante 20 min. La recuperación de antígenos se llevó a cabo con el sistema de microondas (750W, 3 x 1 min) en buffer citrato de sodio 10 mM; pH=6. Para estudiar la expresión de STAT3 las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-STAT3 diluido 1:400 en PBS, ON a 4°C en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron incubando a las muestras con PBS en ausencia del anticuerpo primario. Luego los cortes se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG biotinilado (DAKO LSAB + Kit, HRP) por 30 min y por último con estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO LSAB + Kit, HRP) por 30 min. La reacción de la peroxidasa con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) (DAKO LSAB + Kit, HRP) formó un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. Se

realizó una leve contra-coloración con hematoxilina al 10% y finalmente los cortes fueron montados con bálsamo, en forma definitiva, para su posterior evaluación. Los preparados fueron evaluados por el Dr. Roberto P. Meiss, Jefe de la División Patología Experimental de la Academia Nacional de Medicina. Para el análisis cuantitativo el área celular fue segmentada en cada imagen (cinco secciones de cada grupo de tumores) se determinó la intensidad media y se consideró la diferencia entre este valor y el fondo. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM. El valor P fue estimado usando el Test t de Student (dos colas).

### **II.8 Análisis estadístico**

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar (SD) o promedio de error estándar (S.E.M) de “n” experimentos independientes. Para los ensayos in vitro se utilizó el test de Mann-Whitney (test no-paramétrico) con  $P < 0,05$  como criterio para la significancia estadística.

## **RESULTADOS**

---

Los andrógenos y el AR son críticos para el desarrollo del PCa (Zhu y Kyprianou 2008) y la activación constitutiva del dominio de unión al ligando de dicho receptor, aún en ausencia de hormonas, es suficiente para convertir un PCa hormona-dependiente a un estado refractario (Chen C. D. et al. 2004). El AR recluta varios co-activadores/co-represores y factores de transcripción modificando la expresión de genes blanco (Roy et al. 2001). Recientemente se reportó que las citoquinas participan en la modulación de la activación del AR y en el crecimiento y diferenciación del PCa (Chun et al. 2009).

Aproximadamente entre el 80% y el 90% de los tumores metastásicos de próstata son inicialmente sensibles a andrógenos, motivo por el que se utiliza como terapia la castración química o deprivación hormonal (Amaral et al. 2012). Sin embargo, con el tiempo este tipo de terapia muchas veces falla y el cáncer progresa a una etapa conocida como resistente a la castración o refractario a hormonas, donde el tumor crece a pesar de la ablación de andrógenos.

Se ha demostrado que muchas vías de señalización pueden contribuir a una activación incrementada del AR durante la progresión del PCa al estado refractario a hormonas (Zhu y Kyprianou 2008). Por ello la regulación en algunas de tales vías tendría propiedades anti-tumorales en el PCa.

En nuestro laboratorio documentamos por primera vez que la hemo oxigenasa-1 (HO-1) se expresa en carcinomas primarios prostáticos humanos y se localiza en el núcleo (Sacca et al. 2007). En líneas celulares de PCa comprobamos que la inducción farmacológica y genética de su expresión induce su localización nuclear e inhibe la proliferación, la migración y la invasión, retarda el crecimiento de tumores in vivo y modula negativamente la expresión de genes relacionados con la inflamación y la angiogénesis (Gueron et al. 2009). Además demostramos que la inducción de HO-1 desafía el disparo de la angiogénesis in vivo a través de un mecanismo parcialmente mediado por NFκB (Ferrando et al. 2011).

Teniendo en cuenta estos antecedentes que reportan la actividad anti-tumoral de HO-1 y que la translocación nuclear de esta proteína se encuentra bien descrita y ocurre en respuesta a diferentes estímulos (Lin Q. et al. 2007; Sacca et al. 2007; Gueron et al. 2009), HO-1 podría actuar como un co-regulador de receptores nucleares o bien modificar el microambiente tumoral modulando la expresión de factores inflamatorios y angiogénicos que actuarían como co-reguladores de dichos receptores generando un fenotipo tumoral menos agresivo.



## **I. EFECTOS DE HO-1 SOBRE EL CICLO CELULAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

El cáncer es un conjunto de enfermedades que puede desencadenarse como consecuencia de una proliferación descontrolada de las células, la cual es provocada por fallas en los sistemas de regulación de la división celular.

El ciclo celular es controlado en forma positiva por el ensamblaje de las cdk con múltiples ciclinas específicas de cada fase. Es ampliamente aceptado que existen reguladores negativos del ciclo como por ejemplo, las proteínas p21<sup>CIP1/WAF1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>, que se acoplan al complejo ciclina/ckd y lo inhiben (Bagui et al. 2000).

Existen diferentes puntos de control en el ciclo durante los cuales las células pueden quedar detenidas, debido a que no se encuentran en condiciones de dividirse. Los dos puntos regulatorios más importantes son G0/G1 y G2/M (Schweizer et al. 2008). Las células de cáncer evaden estos controles regulatorios y esto no solo les confiere ventajas proliferativas, sino también una susceptibilidad aumentada a la acumulación de alteraciones genéticas adicionales, promoviendo así la tumorigénesis (De Falco y De Luca 2010).

Considerando que previamente en nuestro laboratorio demostramos que HO-1 disminuye la proliferación de las células de PCa (Gueron et al. 2009), decidimos investigar si la sobre-expresión de HO-1 afecta la progresión del ciclo celular.

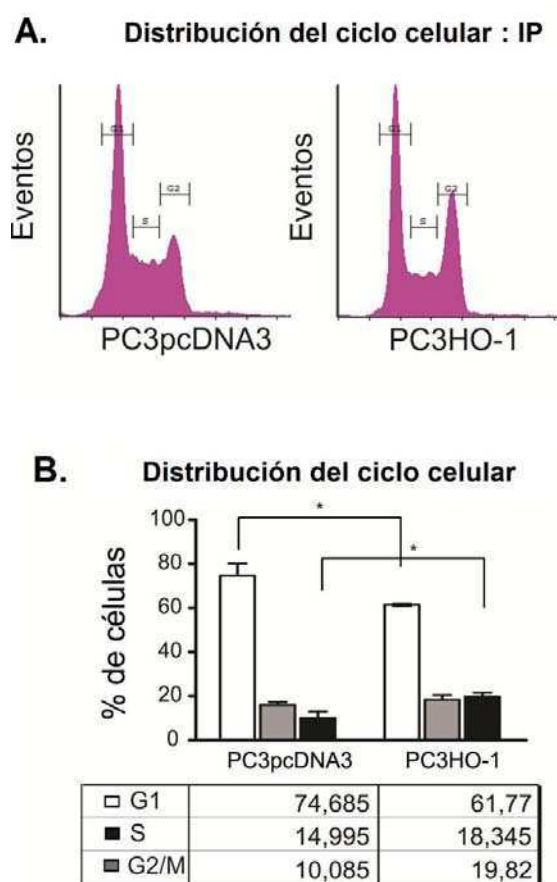
### **I.1 HO-1 induce la acumulación de la población celular en la fase G2/M del ciclo**

Para determinar si la disminución de la proliferación por inducción de HO-1 en el PCa es consecuencia de alteraciones en la progresión del ciclo, decidimos utilizar la línea celular PC3HO-1 transfectada establemente con un plásmido de expresión de HO-1 y su control (PC3pcDNA3, transfectada con el vector vacío). La línea PC3HO-1, en la cual la inducción de la expresión de HO-1 es de 5 veces, fue generada en nuestro laboratorio a partir la línea parental PC3, insensible a andrógenos y con niveles basales bajos de HO-1 (Gueron et al. 2009).

Mediante citometría de flujo analizamos la distribución de las poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo para ambas líneas, empleando la marcación con yoduro de propidio.

La sobre-expresión de HO-1 aumentó significativamente el porcentaje de células en la fase G2/M respecto al control (19,82% vs 10,08%;  $P < 0,05$ ) a expensas de una ligera disminución en la fase G1 ( $P < 0,05$ ) (Fig. 22).

De acuerdo con los hallazgos previos del laboratorio, en los cuales se detectó una reducción en la proliferación de las células PC3HO-1 en comparación con el control (Gueron et al. 2009), esta acumulación de células en fase G2/M en la línea que sobre-expresa HO-1, podría indicar un arresto en dicha fase del ciclo.

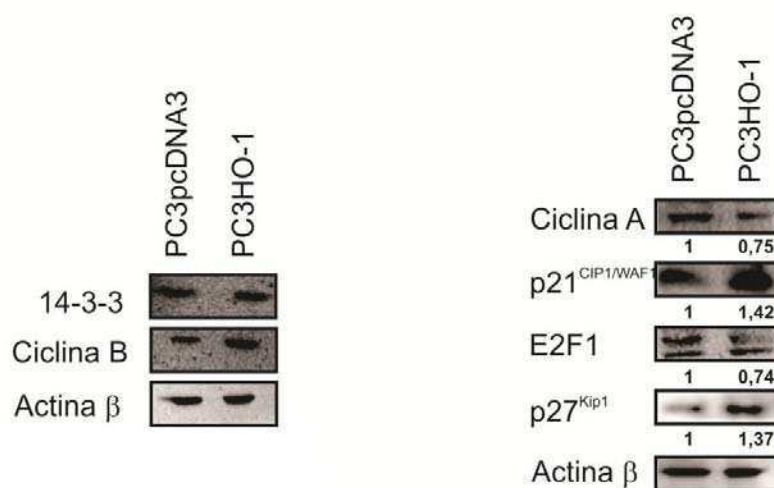


**Figura 22.** Efecto de la sobre-expresión de HO-1 en la progresión del ciclo celular en la línea PC3. Las células PC3HO-1 y PC3pcDNA3 fueron analizadas mediante marcación con Ioduro de Propidio (IP) por citometría de flujo. A) Patrón de fluorescencia de la tinción con IP para la distribución de la población celular. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. B) Las barras representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo y se expresa como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. La tabla muestra los valores de las medias. Diferencia significativa: \*  $P < 0,05$ .

## I.2 HO-1 modifica los niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular

Para determinar si la acumulación de células en la fase G2/M inducida por HO-1 se debe a un arresto del ciclo celular, evaluamos mediante Western blot la expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo. Aislamos extractos proteicos de las líneas PC3HO-1 y PC3pcDNA3 y analizamos los niveles de 14-3-3 $\sigma$  y Ciclina B debido a que está claramente documentada la participación de ambas proteínas en la transición G2/M (Canela et al. 2003; Hermeking y Benzinger 2006) y particularmente la inducción de 14-3-3 $\sigma$  se ha observado aún en células con p53 mutado (Sang et al. 2006). No se detectaron cambios significativos en la expresión de ninguno de estos dos componentes del sistema en respuesta a la sobre-expresión de HO-1 (Fig. 23).

Adicionalmente analizamos la expresión de otros factores involucrados tanto en la progresión del ciclo como en la regulación de este punto de control. Evaluamos los niveles de Ciclina A y E2F1. La inducción de HO-1 provocó una disminución en los niveles de estos reguladores positivos de progresión (Fig. 23). Determinamos la expresión de los inhibidores del ciclo p21<sup>CIP1/WAF1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>. Se evidenció un claro incremento en los niveles de estas proteínas en las células PC3HO-1 respecto a los controles (Fig. 23). Estos resultados muestran que la acumulación de células en la fase G2/M corresponde a un arresto del ciclo celular, provocado por un incremento en los inhibidores y una disminución de las proteínas de progresión Ciclina A y E2F1, en respuesta a la inducción de HO-1.



**Figura 23.** La inducción de HO-1 modifica la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en la línea celular PC3.

Se realizaron lisados de proteínas totales de las líneas PC3HO-1 y PC3pcDNA3 y la expresión de las proteínas indicadas se analizaron por Western blot. Los números debajo de las bandas representan la cuantificación de los niveles proteicos realizada usando el software ImageJ, se relativizaron a los niveles de Actina  $\beta$  de cada muestra y al control. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes con resultados similares.

A partir de estos resultados podemos proponer que la sobreexpresión de HO-1 produce un arresto del ciclo celular en la fase G2/M

## **II. EFECTOS DE HO-1 SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

Observando el arresto del ciclo celular que produce la sobre-expresión de HO-1 en células de PCa, decidimos estudiar la vía del AR por su importancia como factor pro-proliferativo de las células de próstata tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Los andrógenos son importantes para la proliferación de las células de PCa y en los cánceres la ablación de dichas hormonas controla el crecimiento tumoral hasta que la enfermedad progresa hacia el estadio de independencia de andrógenos. Estudios histoquímicos realizados en muestras de pacientes con cánceres refractarios a hormonas muestran que estos tumores poseen altos niveles de expresión del AR (Ruizeveld de Winter et al. 1994; Yuan y Balk 2009).

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Sacca et al. 2007; Gueron et al. 2009; Ferrando et al. 2011) demostraron que HO-1 modula negativamente el crecimiento de las células de PCa in vitro y de los tumores xenotransplantados en ratones nu/nu in vivo. En base a estos antecedentes decidimos analizar el efecto de HO-1 en la modulación de la señalización del AR.

### **II.1 HO-1 reprime la transcripción del PSA en respuesta a testosterona**

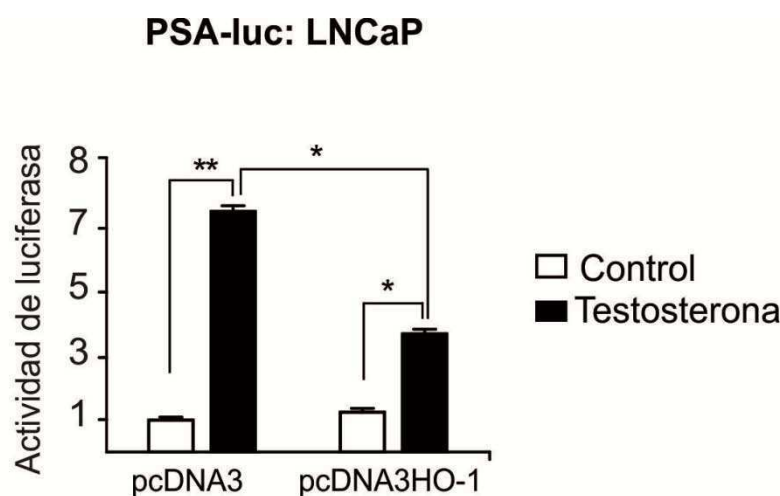
El gen del PSA como se mencionó previamente es un blanco específico de la señalización por el AR, esto se debe a la presencia en su promotor de secuencias de respuesta a andrógenos (ARE) (Balk et al. 2003), que son sitios donde el AR, activado por testosterona, se asocia al ADN promoviendo la transcripción génica.

En nuestro laboratorio se diseñó previamente un gen reportero, conteniendo la región correspondiente a 4,3 Kb desde el sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen del PSA río arriba del gen de la luciferasa. Esta región contiene los tres sitios ARE descritos hasta el momento, que permiten la regulación por andrógenos (Zalazar 2009).

Mediante un ensayo con este gen reportero acoplado a luciferasa se evaluó en la línea celular LNCaP (sensible a andrógenos) la actividad del promotor del gen del PSA. Para activar

al AR las células se estimularon con testosterona y se midió la actividad de luciferasa en condiciones basales o de sobre-expresión de HO-1, mediante la transfección transiente de dichas células con un vector de expresión para esta proteína.

El tratamiento con testosterona produjo la esperada inducción de la actividad del promotor del PSA respecto al control (7,4 veces;  $P < 0,01$ ). La sobre-expresión de HO-1 causó una represión significativa (50%;  $P < 0,05$ ) en la inducción de la actividad del gen reportero en presencia de la hormona (Fig. 24). Sin embargo, la sobre-expresión de HO-1 no ocasionó cambios en los niveles basales de la actividad de luciferasa.

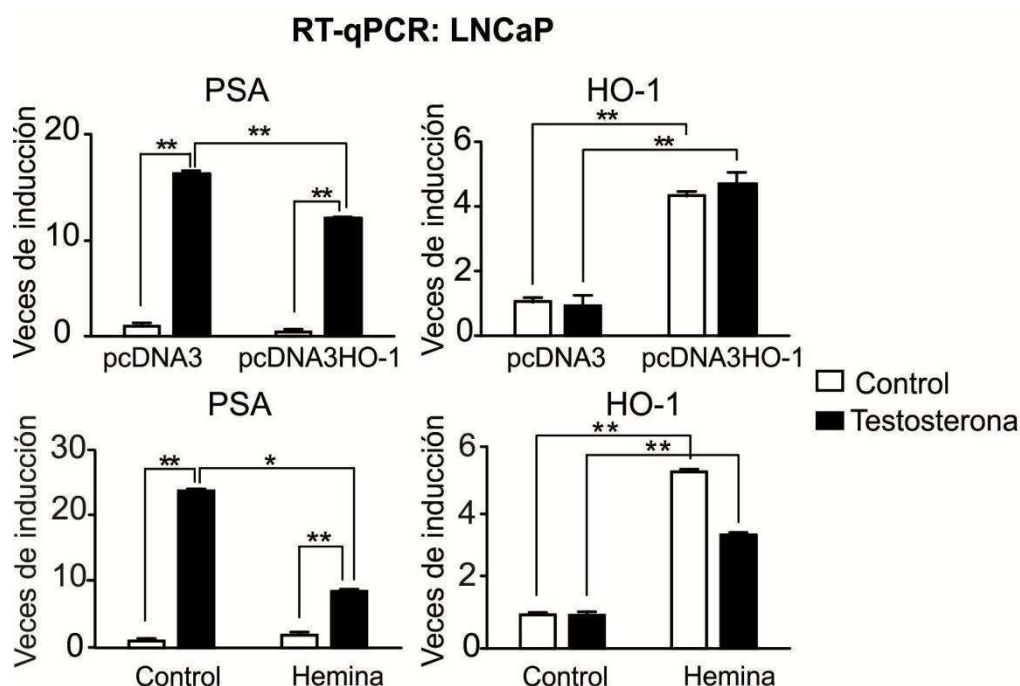


**Figura 24.** Represión por HO-1 de la actividad del promotor de PSA en la línea celular LNCaP.

Las células LNCaP transfectadas transientemente con el plásmido de expresión de HO-1 (pcDNA3HO-1) o el plásmido vacío (pcDNA3) fueron co-transfectadas con el plásmido reportero que contenía 4,3 Kb del promotor de PSA clonado río arriba del gen de luciferasa (PSA-luc). Las células fueron cultivadas en medio libre de rojo fenol, suplementado con suero deprivado de hormonas, en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h). Posteriormente fueron lisadas y se llevó a cabo el ensayo de luciferasa. Cada transfección se realizó por triplicado. Los datos se normalizaron respecto a la concentración de proteínas totales. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  SD. Diferencia significativa: \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

Para verificar el efecto represor de HO-1 sobre la transcripción del PSA, decidimos evaluar los niveles del ARNm del PSA en condiciones de estimulación del AR con testosterona y bajo la inducción de HO-1 tanto a nivel genético, mediante transfección con el vector de expresión de HO-1, como a nivel farmacológico por tratamiento con hemina, un inductor específico de HO-1 (Gueron et al. 2009). Mediante RT-qPCR observamos un aumento significativo en los niveles del ARNm del PSA cuando las células fueron tratadas con testosterona ( $P < 0,01$ ). Sin embargo, el incremento en la actividad transcripcional del PSA fue reprimido tanto por inducción genética (28,2%;  $P < 0,01$ ) como farmacológica (63,7%;  $P < 0,05$ )

(Fig. 25, panel izquierdo) de HO-1. Para cada tratamiento se confirmó el aumento de los niveles del ARNm de HO-1 (Fig. 25, panel derecho).



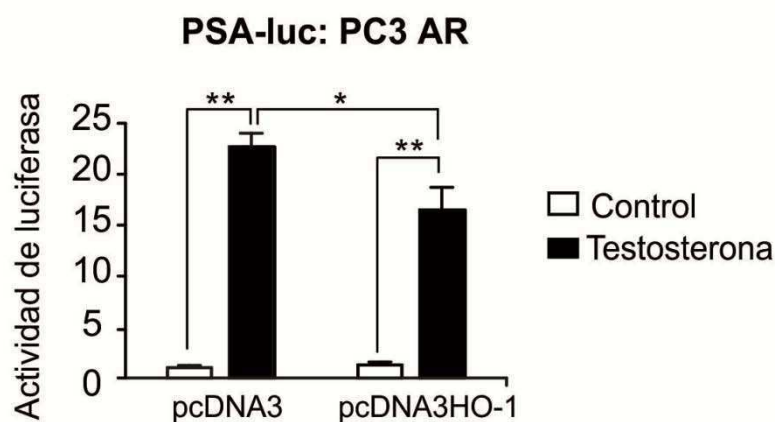
**Figura 25.** Represión por HO-1 de los niveles de ARNm de PSA en la línea celular LNCaP.

Las células LNCaP fueron transfectadas transientemente con el plásmido de expresión de HO-1 (pcDNA3HO-1) o el plásmido vacío (pcDNA3) (panel superior) o se trataron con vehículo (control) o hemina (80 mM, 24 h) (panel inferior) y se cultivaron en medio sin rojo fenol, suplementado con suero depletado de hormonas, en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h). Posteriormente se extrajo el ARN total y se evaluaron los niveles de ARNm de PSA (panel izquierdo) o de HO-1 (panel derecho) por RT-qPCR. Cada transfección se realizó por triplicado. Los datos se normalizaron respecto Actina  $\beta$ . Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. Diferencia significativa: \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

Con el objetivo de extender nuestros hallazgos de la modulación negativa ejercida por HO-1 sobre la inducción del gen del PSA provocada por testosterona, decidimos utilizar otra línea celular de PCa. A partir de la línea PC3, insensible a andrógenos y con niveles basales bajos de HO-1, en nuestro laboratorio generamos la línea PC3HO-1 con expresión estable de esta proteína y su control (PC3pcDNA3, transfectada con el vector vacío) (Gueron et al. 2009). Como estas células no expresan al AR, fueron también transfectadas transientemente con un vector de expresión de este receptor.

Mediante el ensayo de genes reporteros, comprobamos que las células transfectadas con el AR respondían al tratamiento con testosterona, incrementando la actividad del promotor del PSA. Nuevamente observamos también en esta línea celular, que la sobre-expresión de

HO-1 parcialmente reprime (27,3%;  $P < 0,05$ ) la inducción de la actividad del promotor provocada por la hormona (Fig. 26).



**Figura 26.** Represión por HO-1 de la actividad del promotor de PSA en la línea celular PC3.

La células PC3HO-1 y PC3pcDNA3 transfectadas transientemente con el plásmido de expresión del AR fueron co-transfectadas con el plásmido reportero que contiene 4,3 Kb del promotor de PSA clonado río arriba del gen de luciferasa (PSA-luc). Las células fueron cultivadas en medio sin rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas, en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h). Posteriormente fueron lisadas y se llevó a cabo el ensayo de luciferasa. Cada transfección se realizó por triplicado. Los datos se normalizaron respecto a la concentración de proteínas totales. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  SD. Diferencia significativa: \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

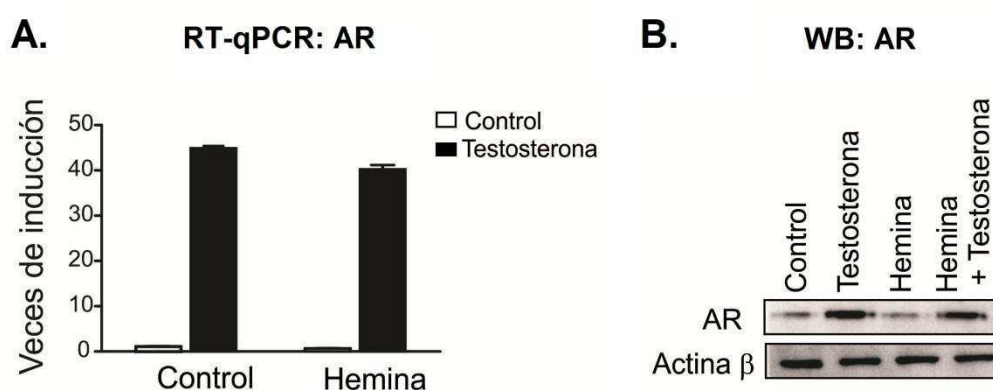
En resumen, estos hallazgos revelan que HO-1 reprime la transactivación del AR inducida por la hormona, definiendo un nuevo rol para esta proteína como regulador negativo de la actividad del AR en respuesta a testosterona.

## II.2 HO-1 no modifica ni la expresión ni la localización celular del AR en respuesta a testosterona

El AR pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas, se localiza en el citoplasma, y cuando es activado por su ligando, se fosforila, dimeriza y se transloca al núcleo actuando como un factor de transcripción, asociándose y regulando a promotores génicos.

Basándonos en el efecto de represión que ejerce HO-1 sobre la transcripción del gen del PSA decidimos estudiar los mecanismos involucrados. Teniendo en cuenta que muchos autores reportan una disminución en la transcripción del PSA como consecuencia de la reducción en la expresión (Han H. Y. et al. 2008; Wang X. L. et al. 2011) o en la translocación

nuclear del AR (Stan y Singh 2009; Darshan et al. 2011), nos propusimos investigar el efecto de HO-1 sobre los niveles de expresión y sobre la localización del receptor en respuesta al tratamiento con testosterona. Utilizamos células LNCaP estimuladas con esta hormona y analizamos por RT-qPCR la transcripción del gen del AR en ausencia o presencia de hemina y los niveles proteicos de este receptor por Western blot (Fig. 27). Pudimos verificar que el tratamiento con testosterona incrementaba la expresión del AR tanto a nivel del ARNm (Fig. 27 A) como de la proteína (Fig. 27 B). Sin embargo, el tratamiento con hemina no produjo modificaciones en el AR en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas (Fig. 27). De esta forma concluimos que la inducción de HO-1 en las células LNCaP no altera los niveles de expresión del AR, ya sea en condiciones basales o bajo activación con testosterona.



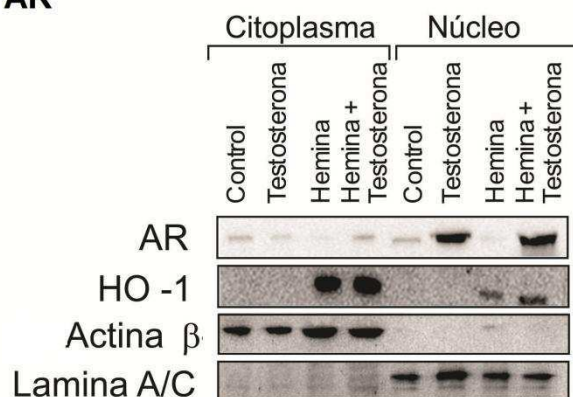
**Figura 27.** La inducción de HO-1 no modifica los niveles de expresión del AR en la línea celular LNCaP. Las células LNCaP fueron cultivadas en medio sin rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas, en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h) y se trataron con vehículo (control) o con hemina (80 mM, 24 h). A) Se extrajo el ARN total y los niveles de ARNm del AR se determinaron por RT-qPCR. Los datos se normalizaron respecto Actina  $\beta$ . Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. B) Se realizaron lisados de proteínas totales y se analizaron los niveles del AR por Western blot. La Actina  $\beta$  se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Para determinar si la inducción de HO-1 producía un cambio en la localización celular del AR, en condiciones basales o cuando el receptor es activado por testosterona, realizamos fraccionamiento subcelular de los extractos proteicos de LNCaP y medimos los niveles del AR por Western blot. De acuerdo a lo reportado en otros trabajos (Liu S. et al. 2010; Kim Y. S. et al. 2012) comprobamos la localización nuclear del receptor en respuesta a testosterona, pero no detectamos diferencias significativas provocadas por el tratamiento con hemina en cuanto a la localización nuclear del AR (Fig. 28 A).

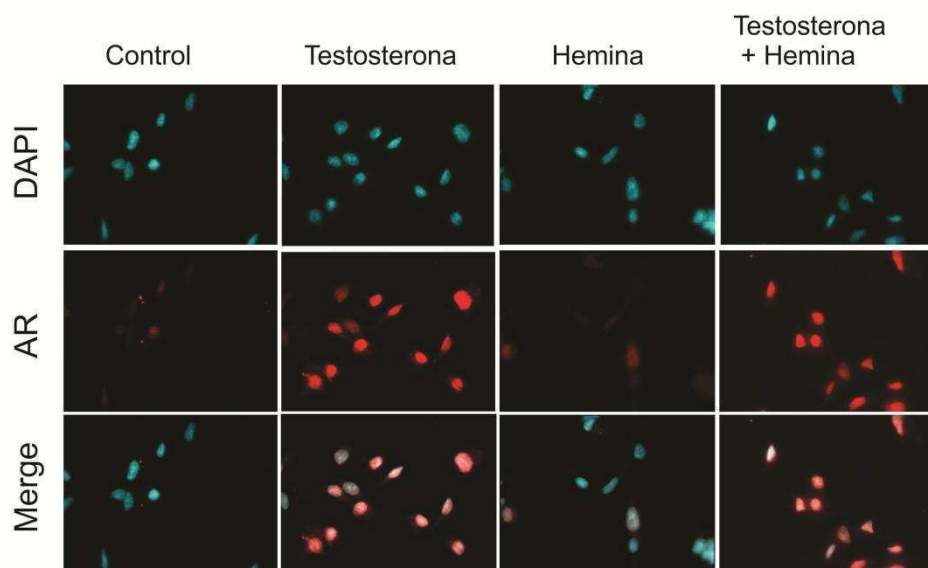


Estos resultados fueron confirmados mediante inmunofluorescencia. Como muestra la figura 28 B, el AR se localiza en el núcleo en respuesta a la estimulación por testosterona, pero su distribución celular no se modifica por inducción de la expresión de HO-1.

### A. WB: AR



### B. Inmunofluorescencia: AR/DAPI



**Figura 28.** La inducción de HO-1 no modifica la localización celular del AR en la línea LNCaP.

Las células LNCaP fueron cultivadas en medio sin rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas, en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h) y se trataron con hemina (80 mM, 24 h) o vehículo (control). A) Se prepararon extractos proteicos citosólicos y nucleares y se determinaron los niveles de AR y HO-1 por Western blot. Para controlar la eficiencia del fraccionamiento subcelular se reveló con anticuerpo anti Actina  $\beta$ , marcador citosólico, y con anticuerpo Lamina A/C, marcador nuclear. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. B) Las células fueron fijadas en metanol y se estudió por inmunofluorescencia la distribución del AR (rojo: Alexa Fluor 555). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). La co-localización nuclear (magenta) se muestra en los paneles Merge. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Magnificación final 400x.

En conjunto estos resultados demuestran que la represión en la expresión del PSA causada por HO-1, no se debe ni a una disminución en la expresión del AR ni a cambios en su localización bajo inducción de HO-1.

### **III. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN NUCLEAR DE HO-1 Y SU ASOCIACIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

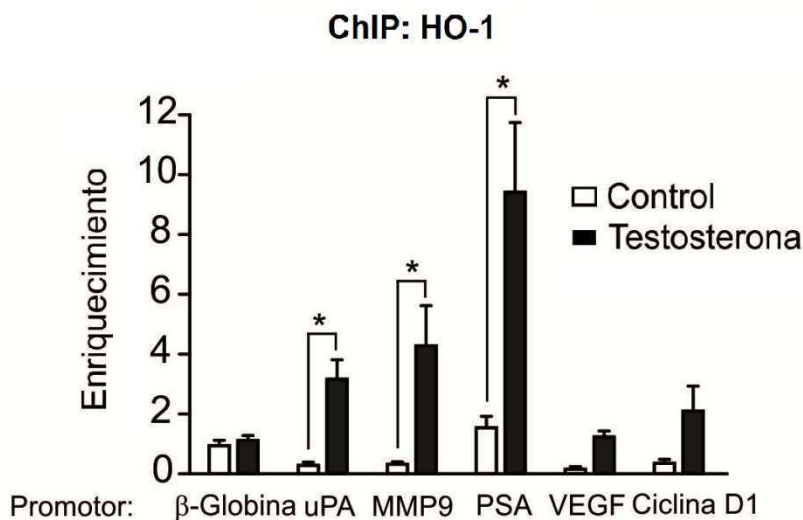
HO-1 es una proteína citoprotectora, responsable de catalizar la degradación oxidativa del grupo hemo. Fue inicialmente descrita como una proteína de localización microsomal (Yoshinaga et al. 1982). Actualmente se sabe que HO-1 también se encuentra en membrana plasmática, mitocondria y núcleo; y aún se trata de identificar sus funciones en los distintos compartimentos (Grochot-Przeczek et al. 2012).

Trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio, demostraron por primera vez la localización nuclear de HO-1, lo cual podría asociarse a una nueva función para esta proteína en el PCa más allá su actividad catalítica (Sacca et al. 2007; Gueron et al. 2009). Nuestro siguiente objetivo fue caracterizar el rol de HO-1 en los diferentes compartimentos celulares en el PCa.

#### **III.1 HO-1 se asocia a los promotores génicos de MMP9, uPA y PSA en respuesta a testosterona**

Considerando nuestros hallazgos sobre la localización nuclear de HO-1 en carcinomas primarios de próstata (Sacca et al. 2007), en células de PCa con inducción de HO-1 (Gueron et al. 2009) y en xenotransplantes de PCa (Gueron et al. 2009), decidimos investigar su función nuclear y examinamos su capacidad para asociarse a promotores de genes relevantes en la carcinogénesis prostática mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Las células fueron tratadas con testosterona o con vehículo durante 24 h y luego del crosslinking de las proteínas con el ADN, se realizó la inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo específico anti-HO-1 o anti-IgG como control de especificidad. Mediante qPCR evaluamos el enriquecimiento usando primers específicos para la región promotora proximal de los genes de: uPA, MMP9, PSA, VEGF y Ciclina D1, empleando como control la asociación de HO-1 al promotor de  $\beta$ -Globina. Consideramos un reclutamiento a un promotor dado a aquel enriquecimiento que fuese 3 veces superior al del control. Cuando las células

fueron estimuladas con testosterona observamos un enriquecimiento en las regiones promotoras de uPA, MMP9 y PSA (Fig. 29), indicando la asociación de HO-1 al promotor de estos genes involucrados en la progresión del cáncer.



**Figura 29.** Reclutamiento de HO-1 a los promotores de uPA, MMP9 y PSA en la línea celular LNCaP.

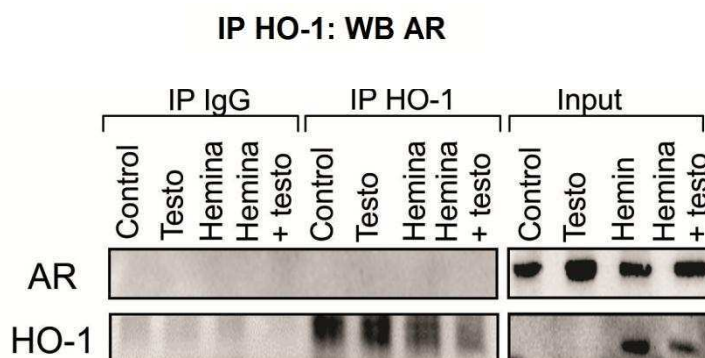
Se realizó la técnica de ChIP en las células LNCaP cultivadas en medio sin rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas, en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h). Se inmunoprecipitó HO-1 o IgG como control de especificidad. El ADN-ChIP fue analizado por qPCR utilizando primers específicos localizados en las regiones promotoras proximales de los genes uPA, MMP9, PSA, VEGF y Ciclina D1 o  $\beta$ -Globina como control negativo. Las veces de enriquecimiento se calcularon relativizando a IgG y al input. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  SD. Diferencia significativa: \*  $P < 0,05$ .

### III.2 HO-1 no se asocia al AR

Como demostramos previamente HO-1 se asocia a los promotores de los genes de uPA, MMP9 y PSA, y regula la transcripción génica de PSA en presencia de testosterona. Sin embargo, HO-1 es una proteína pequeña, no es un factor de transcripción y por lo tanto no posee dominios de unión al ADN, que le permitan unirse directamente a las regiones promotoras de los genes. De este modo consideramos que HO-1 podría regular la transcripción del PSA como resultado de interacciones proteína-proteína, probablemente asociándose a aquellas que forman parte de complejos transcripcionales.

Al observar que HO-1 es reclutado al promotor del gen del PSA y que ejerce un efecto represor sobre la inducción del mismo por testosterona, evaluamos si HO-1 podría estar interactuando con el AR. Para probar esta hipótesis realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas utilizando un anticuerpo policlonal anti-HO-1, en la línea

celular LNCaP sometida a tratamiento con testosterona, hemina, ambas o sus respectivos vehículos como control. Realizamos la detección del AR mediante Western blot, en los extractos proteicos inmunoprecipitados, incubando con un anticuerpo específico para dicho receptor. El input demuestra la presencia de las distintas proteínas en los extractos proteicos totales. Con estos resultados comprobamos que no hay interacción entre HO-1 y AR en las diferentes condiciones experimentales ensayadas (Fig. 30).



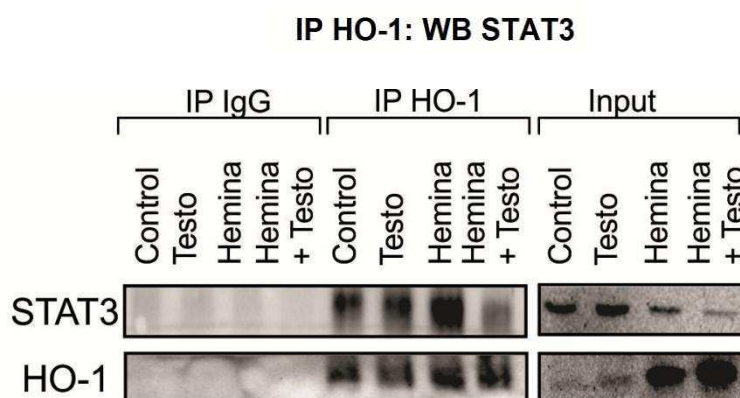
**Figura 30.** *HO-1 no se asocia al AR en la línea celular LNCaP.*

Las células LNCaP fueron cultivadas en medio libre de rojo fenol suplementado con suero privado de hormonas en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h) y tratadas con hemina (80 mM, 24 h) o vehículo (control). Los extractos celulares se inmunoprecipitaron (IP) usando un anticuerpo policlonal anti-HO-1 o IgG como control negativo. Los inmunocomplejos se analizaron por Western blot con los anticuerpos indicados. Una fracción de los extractos proteicos (10%) fue revelada para las proteínas estudiadas con el fin de controlar la eficiencia de la técnica (input). Este experimento se repitió tres veces con resultados similares.

### III.3 HO-1 se asocia a STAT3

STAT3 es un transductor de señales que se encuentra en el citoplasma y al ser activado por una señal (en las células de próstata IL-6, entre otros factores), dimeriza, migra al núcleo y se asocia al ADN en secuencias reguladoras. Este factor de transcripción se encuentra constitutivamente activo en una amplia variedad de tumores incluyendo los de próstata. En diversos trabajos se demostró su importante participación en la progresión del PCa (Abdulghani et al. 2008; Zoubeidi et al. 2009). En base a estas evidencias decidimos investigar si la asociación entre HO-1 y STAT3 podría mediar el efecto de HO-1 sobre la activación transcripcional del AR. Mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación, utilizando un anticuerpo policlonal específico para HO-1, detectamos por Western blot la interacción entre HO-1 y STAT3 en células LNCaP tratadas o no con hemina y/o testosterona (Fig. 31).

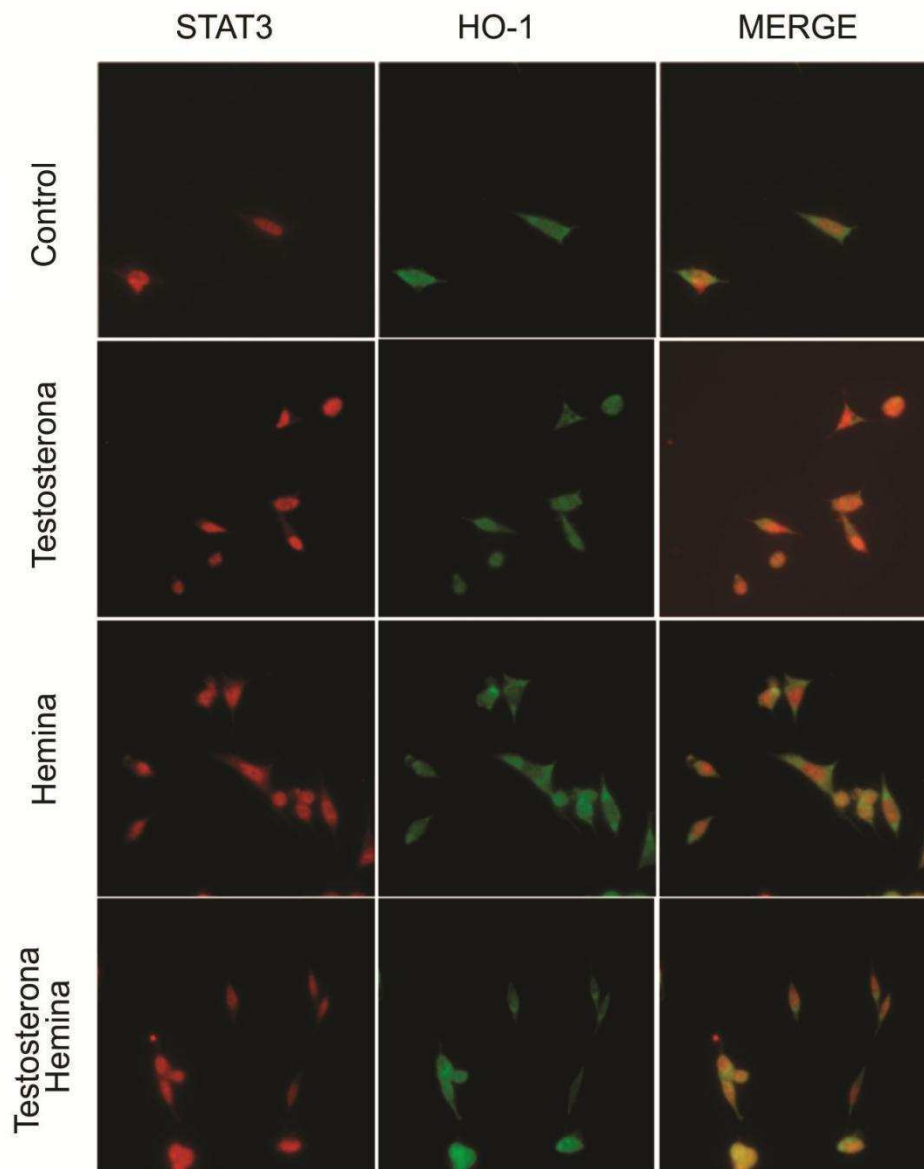
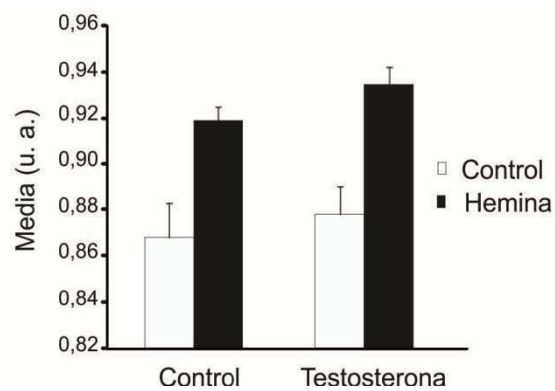
Con estos resultados demostramos que HO-1 es capaz de asociarse a un factor de transcripción, que está bien documentado por su rol en la transactivación del AR en el PCa.



**Figura 31.** *HO-1 interacciona con STAT3 en la línea celular LNCaP.*

Las células LNCaP fueron cultivadas en medio libre de rojo fenol, suplementado con suero deprivado de hormonas en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h) y se trataron con hemina (80 mM, 24 h) o vehículo (control). Los extractos celulares se inmunoprecipitaron (IP) usando un anticuerpo policlonal anti-HO-1 o IgG como control negativo. Los inmunocomplejos se analizaron por Western blot con los anticuerpos indicados. Una fracción de los extractos proteicos (10%) fue revelada para las proteínas estudiadas con el fin de controlar la eficiencia de la técnica (input). Este experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Posteriormente decidimos evaluar mediante microscopía de fluorescencia la co-localización de STAT3 y HO-1 en las células LNCaP bajo tratamiento con testosterona, hemina, ambos o sus respectivos vehículos (control). Las imágenes de la figura 32 A muestran que el tratamiento con hormona estimula la localización nuclear de STAT3. Asimismo se observa el aumento de la expresión y de la localización nuclear de HO-1 por tratamiento con hemina. El porcentaje de co-localización entre ambas proteínas fue cuantificado mediante el coeficiente de Manders. Se detectó un aumento significativo de la co-localización de ambas proteínas por tratamiento con hemina, respecto al control (52%,  $P < 0,01$ ) y por tratamiento con testosterona y hemina respecto al tratamiento con la hormona sola (50%;  $P < 0,05$ ) (Fig. 32 B).

**A. Inmunofluorescencia: HO-1/STAT3****B. Co-localización por Coeficiente de Manders**

**Figura 32.** *HO-1 co-localiza con STAT3 en la línea celular LNCaP.*

Las células LNCaP fueron cultivadas en medio libre de rojo fenol, suplementado con suero deprivado de hormonas en ausencia o presencia de testosterona (10  $\mu$ M, 24 h) y se trataron con hemina (80  $\mu$ M, 24 h) o vehículo (control). A) Se estudió por inmunofluorescencia la distribución de STAT3 mediante un anticuerpo primario anti-STAT3 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 555 (rojo), y la distribución de HO-1 mediante un anticuerpo primario anti-HO-1 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). La co-localización se observa en los paneles Merge (amarillo). Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Magnificación final 400x. B) El coeficiente de Manders (STAT3/HO-1) fue calculado para cada célula individual. Se graficó la media  $\pm$  SD. Diferencia significativa: \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

En resumen, en esta sección demostramos por primera vez que HO-1 se asocia a promotores génicos, que es capaz de interactuar con el factor de transcripción STAT3 y que co-localiza con el mismo en presencia de hemina.

#### IV. EFECTO DE HO-1 EN LA SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT3 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Como mencionamos anteriormente la vía de señalización del factor STAT3 es importante en la progresión del PCa al encontrarse constitutivamente activa. También se demostró que su inhibición lleva a la apoptosis de las células del PCa (Barton et al. 2004).

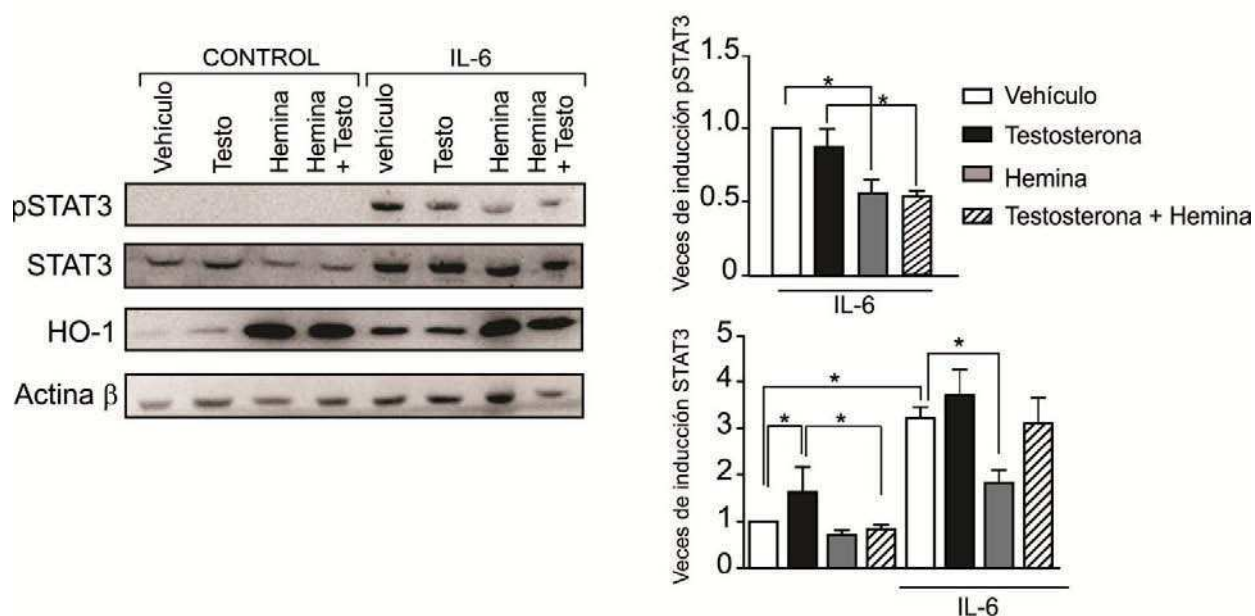
Este factor de transcripción se activa principalmente en las células prostáticas por medio de la citoquina pro-inflamatoria IL-6, la cual se une a su receptor. Esta señal dispara la fosforilación de STAT3, que dimeriza y migra al núcleo asociándose a elementos de respuesta específicos en el ADN. STAT3 regula procesos involucrados en la carcinogénesis como la proliferación, la apoptosis, la angiogénesis y la metástasis (Huang S. 2007).

Basándonos en la asociación que observamos previamente entre STAT3 y HO-1 y considerando la importancia de esta vía en el PCa, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el efecto de la inducción de HO-1 en este camino de señalización.

##### IV.1 HO-1 modula negativamente a STAT3 en células de PCa sensibles a andrógenos

Decidimos evaluar el efecto de la inducción de HO-1 en la expresión de STAT3, así como también en su activación en las células de PCa sensibles a andrógenos. Las células LNCaP se trataron con testosterona para activar la vía del AR, con hemina para inducir a HO-1 y con ambos para investigar el efecto conjunto sobre STAT3. Los cultivos controles fueron expuestos a los respectivos vehículos. Adicionalmente a estos tratamientos, la vía de STAT3

se estimuló por tratamiento con IL-6. Los niveles proteicos de STAT3 y de la forma activa del mismo (pSTAT3<sup>Y705</sup>) se determinaron por Western blot con anticuerpos específicos en estos extractos celulares. Acorde con reportes previos de Aaronson y colaboradores (Aaronson et al. 2007), observamos que el tratamiento con testosterona aumentó significativamente los niveles de STAT3 (1,62 veces;  $P < 0,05$ ) (Fig. 33, panel izquierdo y derecho inferior) y que dicho aumento disminuyó significativamente por tratamiento con hemina (18,4%;  $P < 0,05$ ). Cuando la vía de STAT3 se estimuló con IL-6, se detectó un marcado aumento (3,3 veces;  $P < 0,05$ ) en los niveles totales de STAT3 respecto al control (Fig. 33, panel izquierdo y derecho inferior). Nuevamente el tratamiento con hemina parcialmente reprimió (43,1%;  $P < 0,05$ ) dicha inducción (Fig. 33). Asimismo comprobamos que IL-6 produjo el esperado aumento en la activación de STAT3 en las células LNCaP, detectado por la fosforilación del factor (Fig. 33, panel izquierdo). El tratamiento con hemina disminuyó significativamente los niveles de pSTAT3 en presencia de IL-6 (47,3%;  $P < 0,05$ ) (Fig. 33, panel izquierdo y derecho superior). Este efecto inhibitorio también se detectó en las células LNCaP tratadas con testosterona cuando se cultivaron en presencia de hemina (42,2%;  $P < 0,05$ ) (Fig. 33, panel izquierdo y derecho superior).



**Figura 33.** HO-1 disminuye los niveles de STAT3 y pSTAT3 en la línea celular LNCaP.

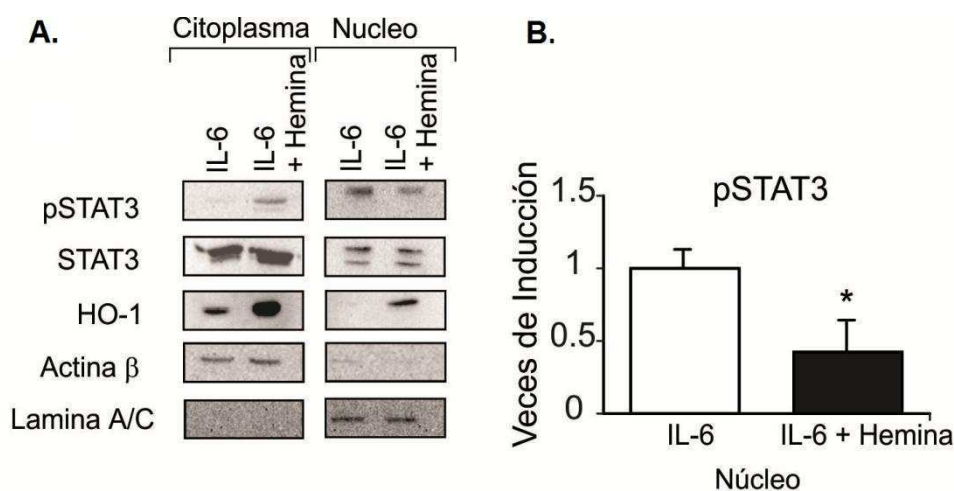
Se realizaron lisados de proteínas totales extraídas de células LNCaP cultivadas en medio sin rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas controles o estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) y tratadas con testosterona (10  $\mu$ M, 24 h), hemina (80 mM, 24 h), ambos o sus respectivos vehículos. Se analizaron los niveles de STAT3, pSTAT3 y HO-1 por Western blot. Los niveles de Actina  $\beta$  se utilizaron como control de carga. Las proteínas se cuantificaron usando el software ImageJ. Los gráficos de barras representan la medición cuantitativa de pSTAT3<sup>Y705</sup> normalizado a STAT3 total



(panel superior derecho) o STAT3 normalizado respecto a Actina  $\beta$  (panel inferior derecho). Se graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. Diferencia significativa: \*  $P < 0,05$ .

#### IV.2 HO-1 induce la retención citoplasmática de STAT3 en células de PCa sensibles a andrógenos

Considerando que la activación de STAT3 requiere de su fosforilación y localización nuclear, decidimos analizar si la inducción de HO-1 producía alteraciones en la localización de STAT3. Se realizaron fraccionamientos subcelulares a fin de obtener los extractos proteicos nucleares y citoplasmáticos de cultivos de células LNCaP estimuladas con IL-6 y tratadas o no con hemina. Los niveles de STAT3 total y de pSTAT3 se determinaron por Western blot en los extractos citoplasmáticos y nucleares y el enriquecimiento de cada fracción se verificó por detección de Actina  $\beta$  y Lamin A/C, respectivamente (Fig. 34). La exposición a hemina disminuyó la translocación de pSTAT3 al núcleo (56,3%,  $P < 0,05$ ) mientras que al mismo tiempo incrementó la retención de pSTAT3 en el citosol (Fig. 34).

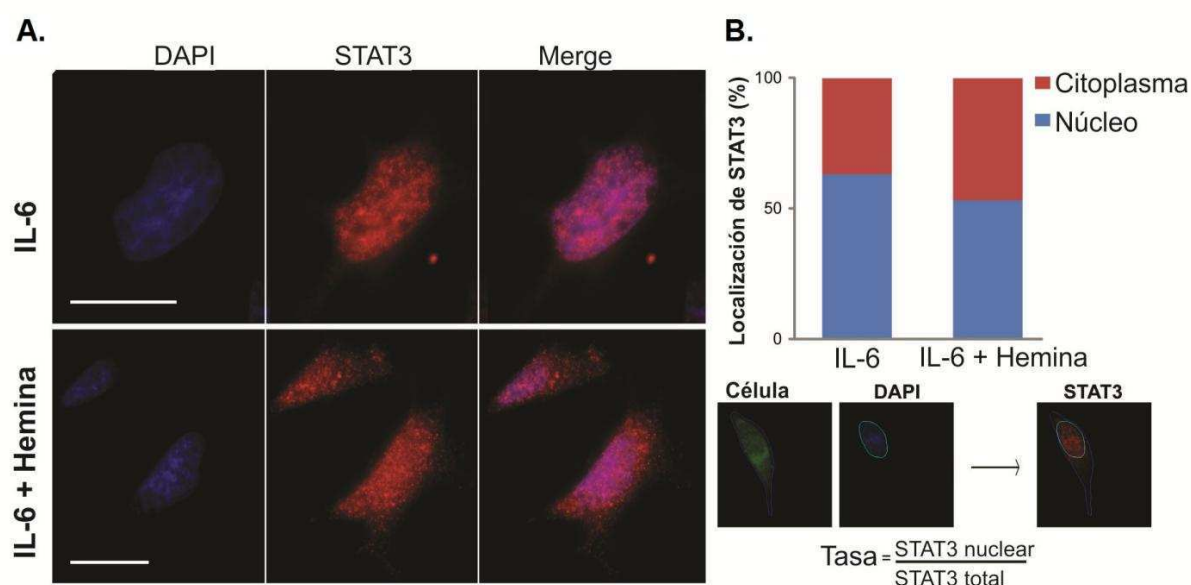


**Figura 34.** HO-1 disminuye la localización nuclear de pSTAT3 en la línea celular LNCaP.

Las células LNCaP estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) se expusieron a hemina (80 mM, 24 h) o vehículo. Las fracciones nucleares y citoplasmáticas fueron extraídas y los niveles de STAT3, pSTAT3 y HO-1 se analizaron por Western blot. La pureza de las fracciones citoplasmática y nuclear se verificó por detección de Actina  $\beta$  y Lamin A/C, respectivamente. Se muestra un experimento representativo de 3 independientes. Los gráficos de barras representan la medición cuantitativa de pSTAT3<sup>y705</sup> normalizado a STAT3. Se graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. Diferencia significativa: \*  $P < 0,05$ .

A fin de corroborar que la inducción de HO-1 provocaba la retención de STAT3 en citoplasma cuando las células se estimulaban con IL-6, decidimos examinar su localización en

los diferentes compartimentos celulares mediante la técnica de microscopía confocal. La inmunomarcación de STAT3 se realizó con un anticuerpo primario específico y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 555. De acuerdo con los resultados anteriores, mediante esta técnica confirmamos que la proteína STAT3 se localiza en el núcleo tras el estímulo con IL-6 y que cuando las células son tratadas con hemina, dicha localización preferentemente nuclear disminuye a expensas de la retención aumentada de este factor en el citoplasma (Fig. 35 A). La cuantificación de la población de células discriminadas en función de la localización celular de STAT3 mostró el mismo resultado (Fig. 35 B).



**Figura 35.** *HO-1* retiene a *STAT3* en el citosol en células LNCaP estimuladas con IL-6 en la línea celular LNCaP.

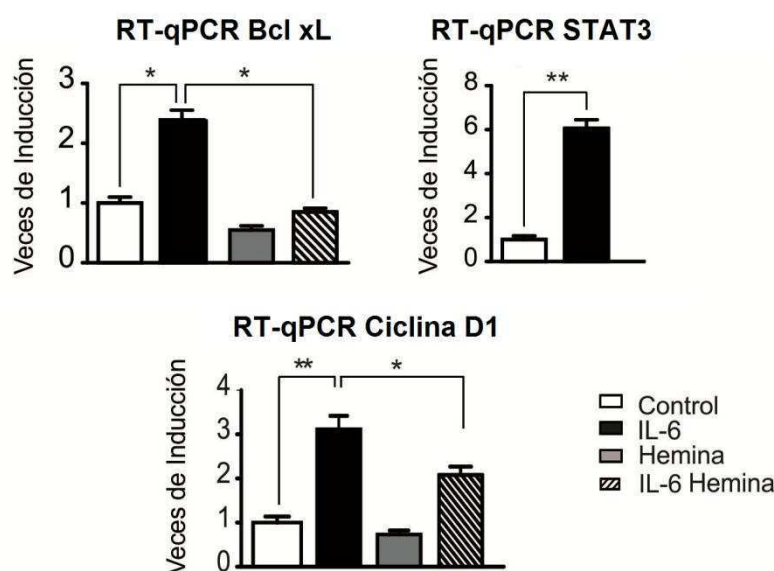
Se estudió la expresión y distribución de STAT3 visualizada mediante inmunofluorescencia por tinción de células LNCaP estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) en ausencia o presencia de hemina (80 mM, 24 h). STAT3 se observa en rojo (Alexa Fluor 555) y los núcleos en azul (DAPI). La co-localización nuclear (magenta) se muestra en los paneles Merge. La segmentación de la célula entera y el núcleo (DAPI) fue realizada para calcular la tasa de STAT3n/STAT3t y STAT3c/STAT3t en un análisis célula a célula. La cuantificación de la localización subcelular de STAT3 se muestra como / de STAT3 en el citoplasma (barra roja) y STAT3 en el núcleo (barra azul). Barra de escala: 10 μm. Se muestra una imagen representativa de cada grupo. Se realizaron 3 experimentos independientes con resultados similares.

### IV.3 HO-1 reprime la expresión de genes regulados por STAT3 en células de PCa sensibles a andrógenos

Como describimos previamente, la vía de señalización de STAT3 requiere que en respuesta a un estímulo externo (en el PCa puede ser la citoquina pro-inflamatoria IL-6) STAT3 se fosforile, se transloque al núcleo y se asocie a promotores génicos regulando su

transcripción. Entre los genes que responden directamente a STAT3 podemos mencionar a Bcl xL (Linfoma de células B extra largo) y a Ciclina D1, ambos relacionados con la supervivencia celular e importantes en la transformación oncogénica del cáncer.

Con el objetivo de evaluar si las diferencias disparadas por hemina sobre la activación y la retención citoplasmática de STAT3 en el citosol, podían afectar la expresión de genes blanco de STAT3, analizamos los niveles de los ARNm de Bcl xL y Ciclina D1. El tratamiento con IL-6 efectivamente indujo la transcripción de estos genes (Bcl-xL 2,4 veces;  $P < 0,05$  y Ciclina D1 3,12 veces;  $P < 0,01$ ), mientras que la inducción farmacológica de HO-1 reprimió significativamente dicho incremento en ambos casos (Bcl-xL: 64,74%;  $P < 0,05$  y Ciclina D1: 33,85%;  $P < 0,05$ ) (Fig. 36). Como control se analizó la inducción de la expresión de STAT3 por IL-6 (Fig. 36).



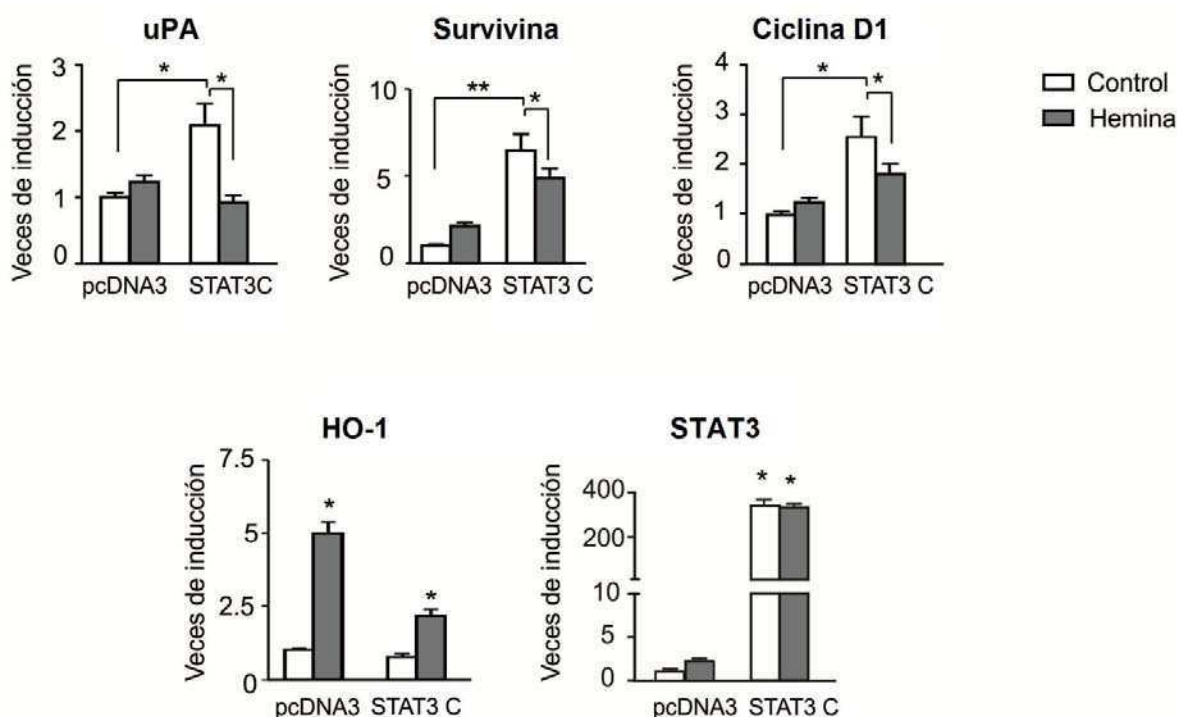
**Figura 36.** HO-1 reprime los niveles de ARNm de Bcl-xL y Ciclina D1 inducidos por IL-6 en la línea celular LNCaP.

Las células LNCaP fueron estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) en ausencia o presencia de hemina (80 mM, 24 h). Se extrajo el ARN total y se evaluaron los niveles de ARNm de Bcl-xL (panel izquierdo superior), de Ciclina D1 (panel inferior) y de STAT3 (panel superior derecho) por RT-qPCR. Los datos se normalizaron respecto a Actina  $\beta$ . Se graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. Diferencia significativa: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

Para corroborar que HO-1 interfiere con la vía de señalización de STAT3 decidimos validar su efecto represor estudiando la transcripción de genes regulados por este factor, pero en esta ocasión, utilizando una construcción de STAT3 constitutivamente activa (STAT3C). Esta construcción se generó por la sustitución de los residuos cisteína por C661A y C663N, que permiten la dimerización y la activación de STAT3 (Bromberg et al. 1999). Las células

LNCaP fueron transfectadas con STAT3C y expuestas a hemina o vehículo. Mediante RT-qPCR se evaluaron los niveles del ARNm de genes blanco de la vía de STAT3 como uPA, Survivina y Ciclina D1. La inducción de STAT3 se confirmó por el incremento de los niveles de su ARNm en las células transfectadas con STAT3C (Fig. 37, panel inferior derecho). También se corroboró que en estas células se mantenía la sobre-expresión de HO-1 producida por el tratamiento con hemina (Fig. 37, panel inferior izquierdo).

La forma constitutivamente activa de STAT3 efectivamente incrementó los niveles de expresión de uPA, Survivina y Ciclina D1 (2,1 veces;  $P < 0,05$ , 6,4 veces;  $P < 0,01$  y 2,6 veces;  $P < 0,05$ , respectivamente) (Fig. 37, panel superior). El tratamiento con hemina reprimió significativamente la inducción de la transcripción de cada uno de estos genes (uPA: 55,68%, Survivina: 24,62% y Ciclina D1: 28,87%;  $P < 0,05$ , respectivamente) (Fig. 37, panel superior). Estos resultados son consistentes con los hallazgos sobre el efecto inhibitorio mediado por HO-1 en la estimulación de la vía de STAT3 provocada por IL-6, descritos previamente en la figura 36.



**Figura 37.** HO-1 disminuye los niveles de ARNm de uPA, Survivina y Ciclina D1 inducidos por STAT3C en la línea celular LNCaP.

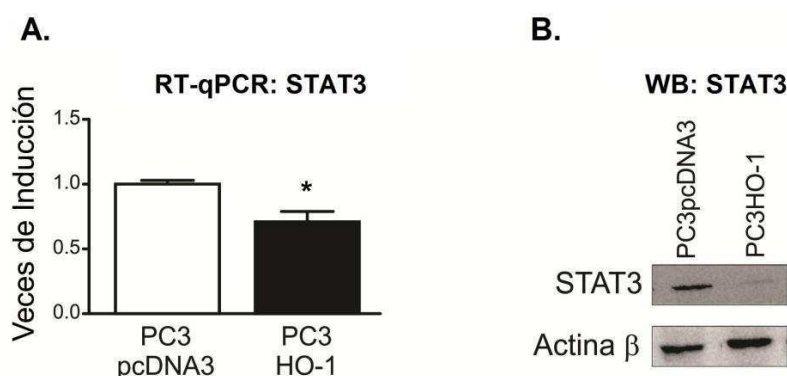
Las células LNCaP transfectadas transientemente con el plásmido de expresión de STAT3 constitutivamente activo (STAT3C) o el plásmido vacío (pcDNA3) fueron cultivadas con hemina (80 mM, 24 h) o vehículo (control). Se extrajo el ARN total y se evaluaron los niveles de ARNm de STAT3, HO-1, uPA, Survivina y Ciclina D1 por RT-qPCR. Los datos se normalizaron respecto Actina  $\beta$ . Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Se

graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. Diferencia significativa: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

A partir de estas observaciones podemos proponer que la inducción de HO-1 disminuye la transcripción de genes blanco de la vía de señalización de STAT3, debido a una disminución en su activación probablemente como consecuencia de la retención de este factor en el citoplasma.

#### IV. 4 HO-1 disminuye la expresión de STAT3 en células de PCa insensibles a andrógenos

Previamente demostramos que la inducción de HO-1 reprime la expresión de STAT3 aún cuando esta proteína es activada por su ligando IL-6, en la línea celular LNCaP que es sensible a andrógenos. Teniendo en cuenta que la línea PC3, insensible a andrógenos, presenta niveles endógenos constitutivamente activos de STAT3 (Mora et al. 2002), nuestro próximo objetivo fue estudiar si el efecto represor de HO-1 sobre los niveles de STAT3 es extrapolable a este nuevo contexto experimental. Así nos propusimos analizar la expresión de STAT3 en la línea celular PC3HO-1 (Gueron et al. 2009) y su control (PC3pcDNA3). Mediante RT-qPCR determinamos los niveles endógenos de STAT3 en dichas células. Comprobamos que los niveles de ARNm de STAT3 estaban significativamente disminuidos (28,3%;  $P < 0,05$ ) en las células con sobre-expresión de HO-1 respecto al control (Fig. 38 A). Esta reducción también se evidenció a nivel proteico mediante Western blot (Fig. 38 B). De esta manera confirmamos que el efecto represor de HO-1 sobre la vía de STAT3 ocurre también en células de PCa insensible a andrógenos.



**Figura 38.** La sobre-expresión de HO-1 disminuye la expresión del STAT3 en la línea celular PC3.

A) Se extrajo el ARN total de las células PC3HO-1 y PC3pcDNA3, y los niveles de ARNm de STAT3 se determinaron por RT-qPCR. Los datos se normalizaron respecto Actina  $\beta$ . Se muestra un experimento

representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Se graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. Diferencia significativa: \*  $P < 0,05$ . B) Se realizaron lisados de proteínas totales de los cultivos de las células PC3HO-1 y PC3pcDNA3 y se analizaron los niveles de STAT3 por Western blot. Los niveles de Actina  $\beta$  se usaron como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

En resumen nuestros hallazgos sugieren que HO-1 es un modulador negativo de STAT3 tanto en células de PCa sensibles como insensibles a andrógenos.

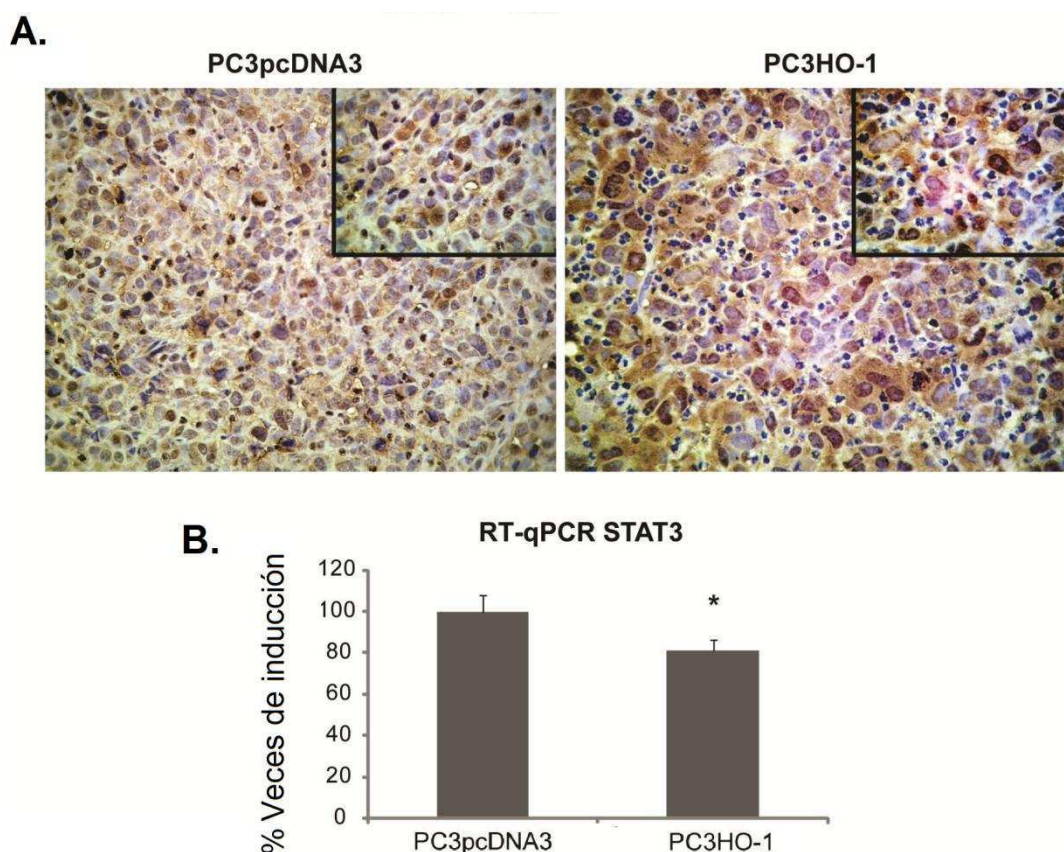
## **V. EFECTO DE HO-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE STAT3 IN VIVO**

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la inducción genética de HO-1 retarda el crecimiento tumoral in vivo (Gueron et al. 2009) y que cumple un rol crítico como modulador negativo del disparo de la angiogénesis (Ferrando et al. 2011). Este efecto inhibitorio de HO-1 sobre el crecimiento tumoral se correlaciona con la represión de la expresión de genes inflamatorios, entre ellos IL-6 (Gueron et al. 2009). Esta interleuquina a través de circuitos autócrinos y parácrinos (Culig et al. 2005; Aaronson et al. 2007) afecta la vía de STAT3 (Aaronson y Horvath 2002) y en consecuencia el crecimiento tumoral (Mora et al. 2002). Nuestro próximo objetivo fue evaluar la expresión y localización de STAT3 utilizando un modelo in vivo.

### **V.1 HO-1 promueve la retención citoplasmática de STAT3 in vivo en tumores de PCa xenotransplantados**

En las secciones anteriores demostramos que la inducción de HO-1 por hemina promueve la localización citoplasmática del factor de transcripción STAT3, cuando éste es activado por su ligando IL-6, en la línea celular LNCaP y la disminución de la expresión de STAT3 en la línea PC3. Nuestro próximo interrogante fue analizar si la sobre-expresión de HO-1 modula la vía de STAT3 in vivo. Para ello, utilizamos muestras obtenidas a partir del modelo de inoculación de células tumorales humanas PC3HO-1 y su respectivo control (PC3pcDNA3) creciendo como xenotransplante en el flanco de ratones inmunosuprimidos atímicos nu/nu desarrollados previamente en nuestro laboratorio (Gueron et al. 2009). Al analizar la expresión de STAT3, ambos grupos de tumores (PC3HO-1 y PC3pcDNA3) mostraron inmunomarcación positiva; sin embargo, los tumores controles presentaron

marcación predominantemente nuclear, mientras que en los tumores que sobre-expresan HO-1 se detectó una gran población de células con inmunomarcación positiva principalmente citoplasmática (Fig. 39 A). Compatible con estos resultados, cuando medimos mediante RT-qPCR los niveles de ARNm para STAT3 en los tumores PC3HO-1, dichos niveles resultaron significativamente menores (20%;  $P < 0,05$ ) respecto a los detectados en los tumores controles (Fig. 39 B). Reportes previos de nuestro grupo de trabajo demostraron que los tumores PC3HO-1 crecidos como xenotransplantes en ratones *nu/nu* durante 23 días presentaban significativamente menor tamaño y eran menos vascularizados que los tumores controles (Gueron et al. 2009; Ferrando et al. 2011). De este modo HO-1 altera la vía de STAT3, tanto *in vitro* como *in vivo* modulando la malignidad de las células de PCa y contribuyendo así al efecto antitumoral previamente descrito.



**Figura 39.** La sobre-expresión de HO-1 disminuye la expresión de STAT3 *in vivo*.

Células PC3HO-1 y PC3pcDNA3 se inyectaron (*s.c.*) en el flanco derecho de ratones nude (*nu/nu*) atímicos. Los animales se sacrificaron a los 23 días y se extrajeron los tumores. A) Se realizó la detección de STAT3 por inmunohistoquímica. Los tumores PC3pcDNA3 (panel izquierdo) muestran una inmunomarcación positiva para STAT3, predominantemente nuclear, en un moderado número de células tumorales (25X), inserto: marcación nuclear intensa (40X). Los tumores PC3HO-1 (panel derecho) muestran inmunomarcación positiva para STAT3 tanto en núcleo como en citoplasma en un gran número de células tumorales (25X); inserto: área que muestra un patrón de marcación predominantemente citoplasmático positivo, difuso e intenso (40X). B) Los tumores PC3HO-1 y

PC3pcDNA3 fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente se extrajo el ARN total y los niveles de ARNm de STAT3 se determinaron por RT-qPCR. Los datos se normalizaron respecto Actina  $\beta$ . Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se calculó la media  $\pm$  SD y se graficó como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

Estos resultados demuestran que la inducción de HO-1 atenúa la señalización de la vía de STAT3, tanto *in vitro* como *in vivo* en el PCa, probablemente como consecuencia de la retención de este factor en citoplasma.

## **VI. EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE STAT3 Y DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

Múltiples hallazgos han demostrado que en células tumorales de próstata existen numerosas vías de transducción de señales que están alteradas y promueven la interacción de factores de transcripción con el AR, causando la activación del mismo a bajas concentraciones de testosterona circulante (Nadiminty y Gao 2012).

STAT3 está involucrado en la patogénesis del PCa (Ni et al. 2000). Se demostró una clara interrelación entre las vías de señalización de STAT3 y AR (Ueda et al. 2002; Yamamoto et al. 2003). La activación constitutiva de STAT3 se ha observado en células y tejidos de PCa (Ni et al. 2000; Mora et al. 2002). Además se demostró que la inhibición de este camino lleva a la apoptosis en las células de PCa (Ni *et al.* 2000) y que STAT3 interactúa físicamente con AR conduciendo a su activación independiente de ligando (Nadiminty y Gao 2012).

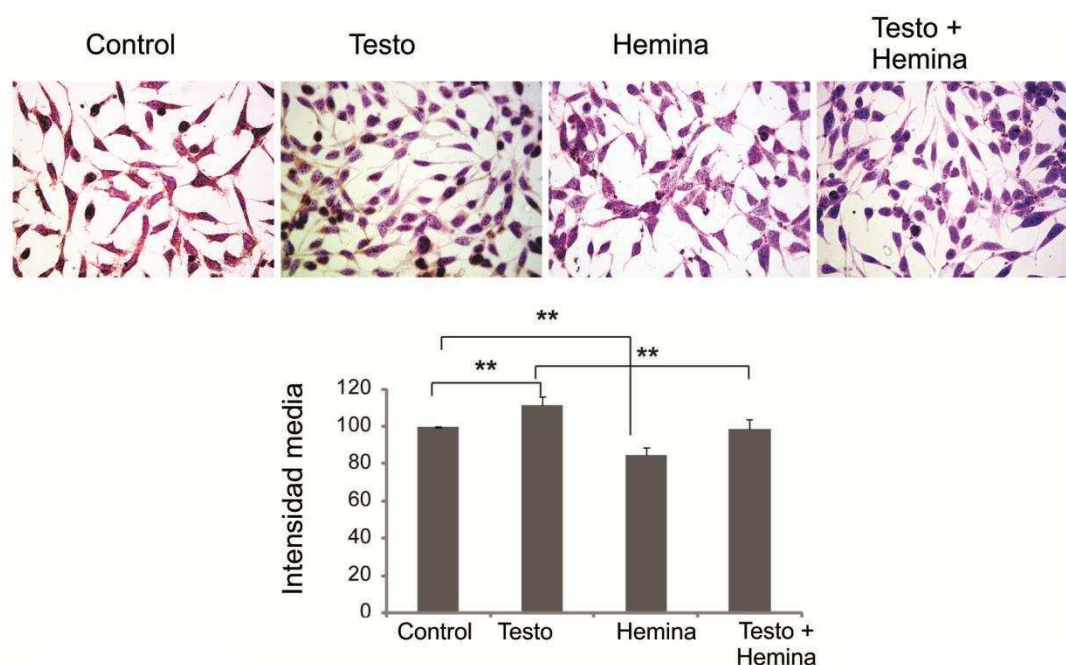
Considerando la participación de STAT3 en la activación del AR y los resultados expuestos en las secciones anteriores, donde demostramos que la inducción de HO-1 conduce a una disminución en la actividad del AR y a una reducción en la señalización de STAT3, nuestro siguiente interrogante fue determinar si la represión ejercida por HO-1 sobre el AR era consecuencia de la interferencia provocada por HO-1 sobre la señalización de la vía de STAT3.



## VI.1 HO-1 induce la retención citoplasmática de STAT3 en células de PCa estimuladas con IL-6 y activadas con testosterona

En una primera aproximación al estudio del efecto de HO-1 sobre la interacción entre los caminos de señalización de STAT3 y AR, decidimos estudiar la localización celular de STAT3 en respuesta a la inducción de HO-1 en presencia y ausencia de testosterona.

Para ello las células fueron tratadas con IL-6 para estimular la vía de STAT3, con testosterona para activar la vía del AR y en presencia de hemina, para evaluar el efecto de la inducción de HO-1. Los controles fueron tratados con los vehículos. Mediante tinción inmunocitoquímica analizamos la expresión de STAT3 empleando marcación con un anticuerpo específico para esta proteína. En primer lugar mediante esta técnica, validamos que el tratamiento con testosterona induce la expresión de STAT3 y su localización nuclear (Fig. 40). Consistente con los resultados previos, demostramos además en este análisis que las células estimuladas con IL-6 mostraron alta tinción nuclear y citoplasmática de STAT3. Esta inmunomarcación se presentó disminuida significativamente por el tratamiento con hemina tanto en las células expuestas o no a testosterona (Fig. 40, panel superior). La inmunorreactividad diferencial de STAT3 fue evaluada cuantitativamente (Fig. 40, panel inferior).

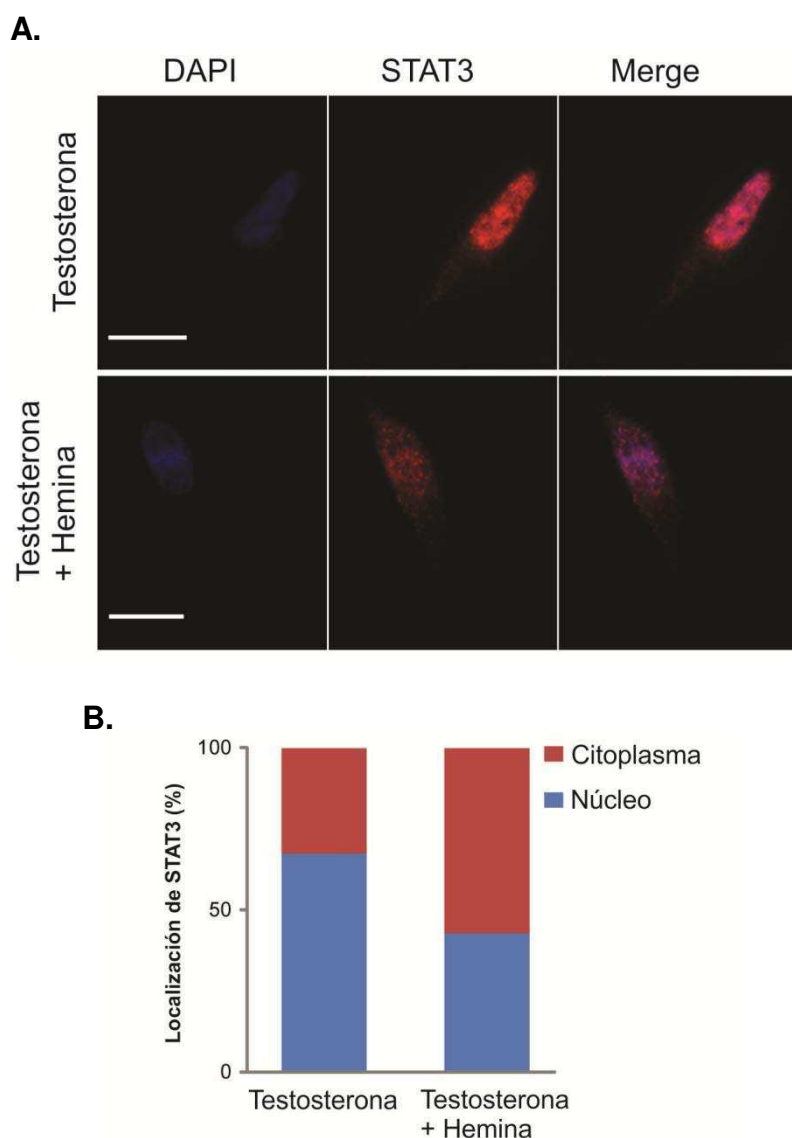


**Figura 40.** HO-1 reduce la expresión de STAT3 estimulada por IL-6 en la línea celular LNCaP en presencia o ausencia de testosterona.

Las células LNCaP fueron cultivadas en medio sin rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas, estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) y tratadas con testosterona (10  $\mu$ M, 24 h), hemina (80 mM, 24 h), ambos o sus respectivos vehículos (control). Las células se fijaron con metanol. Se

estudió por marcación inmunocitoquímica la distribución de STAT3. Magnificación final 400x. Se cuantificó la inmunorreactividad diferencial de STAT3. Se calculó la media  $\pm$  SD y se graficó como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. Diferencia significativa: \*\*  $P < 0,01$ .

Se realizó un análisis más detallado del efecto de la inducción de HO-1 sobre la distribución subcelular de STAT3 mediante inmunofluorescencia en células estimuladas con IL-6 y activadas con testosterona. Los resultados obtenidos confirmaron los hallazgos previos (Fig. 40), evidenciando además la retención citoplasmática de STAT3 en las células tratadas con testosterona y hemina respecto al control tratado solo con testosterona (Fig. 41 A). Estos datos se confirmaron por cuantificación calculando el porcentaje de señal de STAT3 en la fracción nuclear (barra azul) y en la fracción citoplasmática (barra roja) (Fig. 41 B).



**Figura 41.** HO-1 retiene a STAT3 en citosol en células LNCaP estimuladas con testosterona e IL-6.

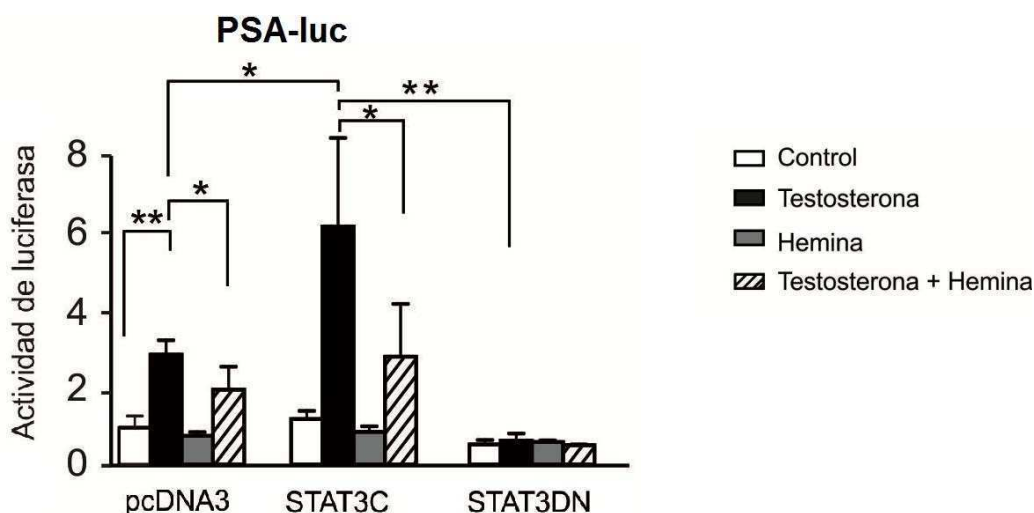
La expresión y distribución celular de STAT3 se visualizó mediante tinción por inmunofluorescencia de células LNCaP cultivadas en medio libre de rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas, estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) y testosterona (10  $\mu$ M, 24 h) en ausencia o presencia

de hemina (80 mM, 24 h). A) STAT3 se observa en rojo (Alexa Fluor 555) y los núcleos en azul (DAPI). La co-localización nuclear (magenta) se muestra en los paneles Merge. Se muestra una imagen representativa de cada grupo de células. Barra de escala: 10  $\mu$ m. B) Cuantificación célula a célula de la localización subcelular de STAT3 expresada como porcentaje de la señal de STAT3 en el citoplasma (barra roja) y en el núcleo (barra azul).

## VI.2 STAT3 media la represión por HO-1 de la vía de señalización del AR

Con el objetivo de evaluar si STAT3 por si mismo podía mediar la represión por HO-1 de la transcripción del PSA, se midió la actividad del promotor de este gen en células LNCaP co-transfectadas con STAT3C o su control y tratadas con testosterona para activar al AR en presencia de hemina para inducir a HO-1. También se utilizó un mutante dominante negativo de STAT3 (STAT3DN), el cual no puede ser fosforilado en la Tyr<sup>705</sup>, compitiendo con la proteína wild type por la quinasa responsable (Bromberg et al. 1999).

En la figura 42 observamos que la transfección de las células LNCaP con STAT3C provocó el esperado aumento de la actividad del PSA-luc por tratamiento con testosterona (6,64 veces de inducción;  $P < 0,05$ ) respecto a su control transfectado con el vector vacío y estimulado con la hormona (3,05 veces de inducción;  $P < 0,01$ ). Estos datos son consistentes con las observaciones realizadas por De Miguel y colaboradores (De Miguel et al. 2003) en cuanto a la co-activación del AR por STAT3. Por otro lado, observamos que el tratamiento con hemina reprimió la inducción de la actividad del reportero provocada por la hormona en condiciones de activación de STAT3 (testosterona y hemina vs testosterona: 55% de represión;  $P < 0,05$ ) (Fig. 42). También se comprobó el efecto represor de la hemina en las células transfectadas con pcDNA3 tratadas con la hormona (Fig. 42). La participación de la vía de STAT3 en la activación del AR se demostró mediante la co-transfección con el mutante negativo el cual abolió completamente la inducción provocada por la hormona (Fig. 42).

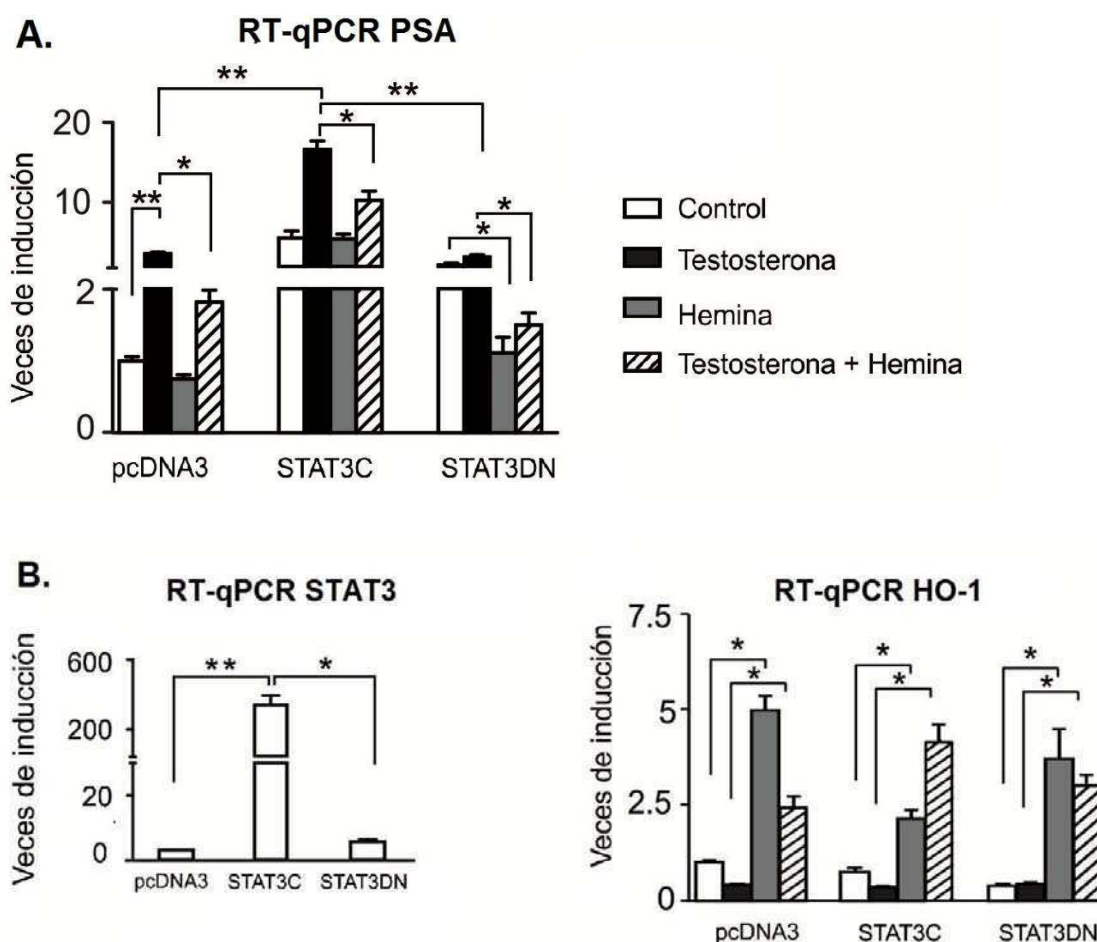


**Figura 42.** HO-1 atenúa la activación del promotor del PSA provocada por STAT3 y testosterona en la línea celular LNCaP.

La células LNCaP transfectadas transientemente con el plásmido de STAT3C (constitutivamente activo), el plásmido STAT3DN (forma dominante negativa de STAT3) o el plásmido vacío (pcDNA3) fueron co-transfectadas con el plásmido reportero PSA-luc. Las células fueron cultivadas en medio libre de rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas y se trataron con testosterona (10  $\mu$ M, 24 h), hemina (80 mM, 24 h), ambos o sus respectivos vehículos (control). Posteriormente fueron lisadas y se llevó a cabo el ensayo de luciferasa. Cada transfección se realizó por triplicado. Los datos se normalizaron respecto a la concentración de proteínas totales. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  SD. Diferencia significativa: \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

Para validar estos resultados evaluamos los niveles de ARNm del gen del PSA en las mismas condiciones. Como se muestra en la figura 43 A, confirmamos mediante RT-qPCR el efecto inhibitorio de la hemina sobre los transcritos del PSA en células LNCaP transfectadas con STAT3C tratadas con testosterona. Esta represión por hemina también se detectó en las células transfectadas con el vector vacío bajo inducción hormonal (Fig. 43 A). Como control, se verificó la inducción provocada por STAT3C en los niveles del ARNm de STAT3 y aquella producida por el tratamiento con hemina en los niveles de HO-1. (Fig. 43 B).

Cabe aclarar que la disminución en la expresión del PSA provocada por hemina se detectó también a nivel del ARNm en las células transfectadas con STAT3DN y tratadas o no con testosterona (Fig. 43 A).

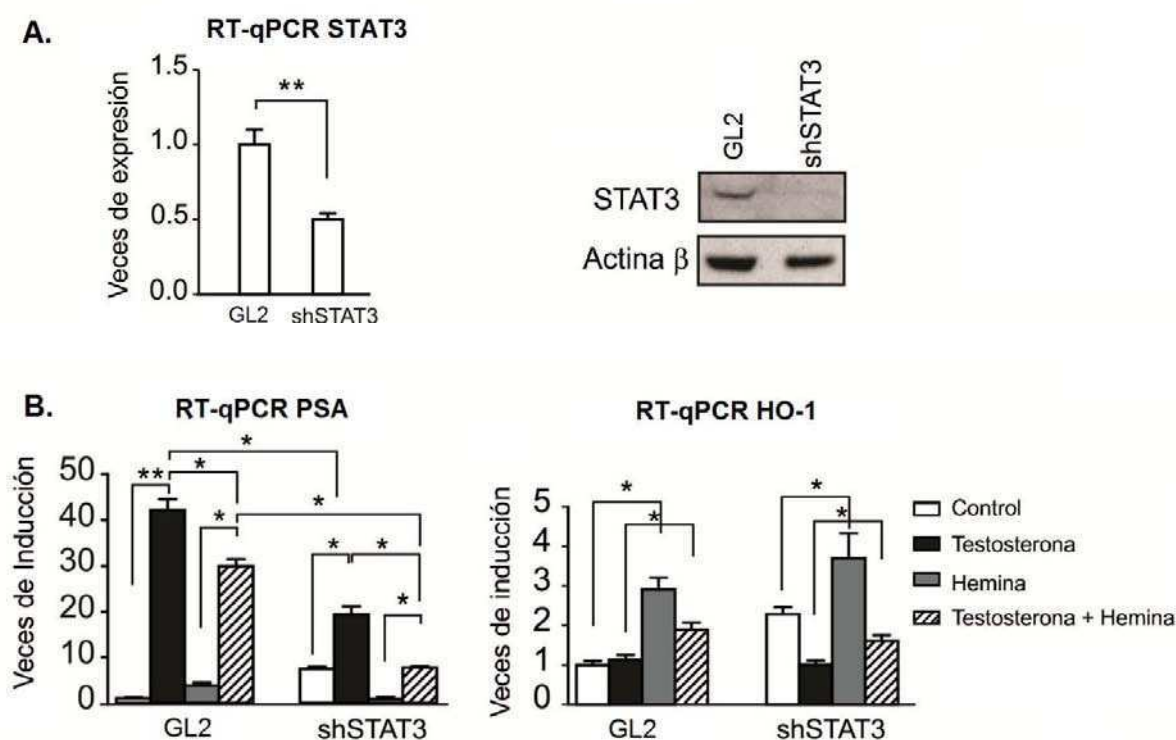


**Figura 43.** HO-1 reprime la inducción de la expresión del ARNm de PSA provocada por STAT3 y testosterona en la línea celular LNCaP.

Las células LNCaP transfectadas transientemente con el plásmido de STAT3C (STAT3 constitutivamente activado), el plásmido STAT3DN (dominante negativo de STAT3) o el plásmido vacío (pcDNA3), fueron cultivadas en medio libre de rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas y se trataron con testosterona (10  $\mu$ M, 24 h), hemina (80 mM, 24 h), ambos o sus respectivos vehículos (control). Posteriormente se extrajo el ARN total. Mediante RT-qPCR se evaluaron los niveles de A) ARNm de PSA y B) ARNm de HO-1 y ARNm de STAT3. Cada transfección se realizó por triplicado. Los datos se normalizaron respecto Actina  $\beta$ . Se graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. Diferencia significativa: \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

Para confirmar si el rol inhibitorio de HO-1 sobre la activación del promotor de PSA es mediado por la atenuación de la vía de STAT3, examinamos los efectos del silenciamiento de esta proteína mediante RNAi usando un sistema de transducción viral con un lentivirus que codifica para el shSTAT3 o el sh control (GL2). Las células LNCaP transducidas con el plásmido de silenciamiento o control se trataron con testosterona, hemina y la combinación de ambas. Se verificó el silenciamiento de STAT3 y se comprobó una significativa reducción a nivel del ARNm y a nivel de la proteína (Fig. 44 A). Este nivel de silenciamiento se reflejó en la disminución de la inducción de los niveles del PSA por testosterona en las células transducidas con el shSTAT3 respecto al control (GL2) (Fig. 44 B).

La inducción de HO-1 por hemina no se vio afectada por la reducción en los niveles de STAT3 (Fig. 44 B). El efecto represor de HO-1 se mantuvo tanto en las células transducidas con el vector control como en las células que tenían silenciada la expresión de STAT3 (Fig. 44 B).



**Figura 44.** Efecto del silenciamiento de STAT3 y la inducción de HO-1 sobre la transcripción de PSA en la línea celular LNCaP.

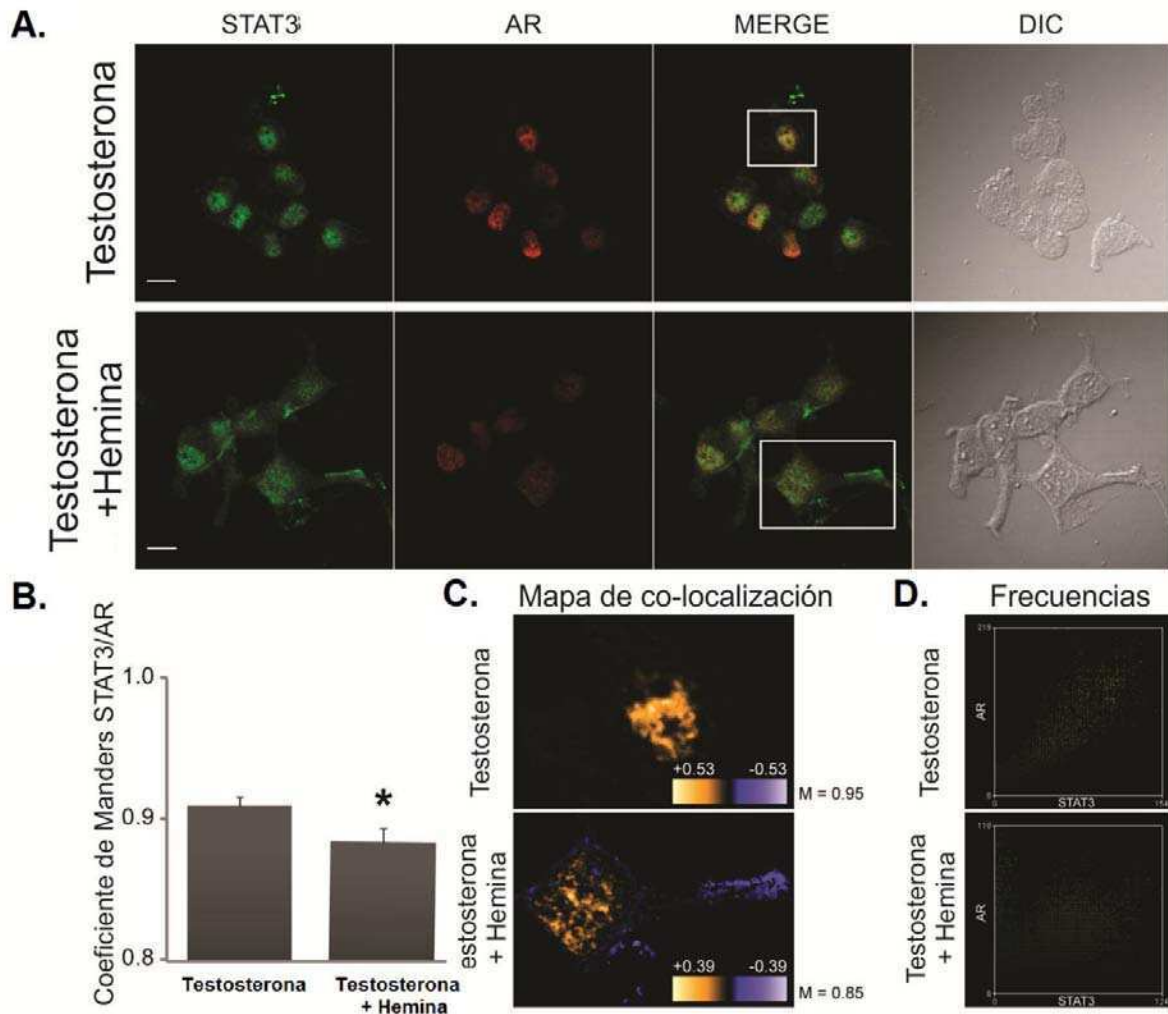
Las células LNCaP fueron transducidas con vectores virales conteniendo shSTAT3 o el vector control (GL2) y se cultivaron en medio libre de rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas bajo tratamiento con testosterona (10  $\mu$ M, 24 h), hemina (80 mM, 24 h), ambos o sus respectivos vehículos (control). Se realizó la extracción del ARN total y de las proteínas de estas células. A) Se evaluaron los niveles de silenciamiento de STAT3 a nivel de ARNm por RT-qPCR y mediante Western blot de los extractos proteicos. B) Se determinaron los niveles de ARNm de PSA y de HO-1 por RT-qPCR. Los datos se normalizaron respecto Actina  $\beta$ . Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficaron las veces de inducción respecto del control  $\pm$  SD calculada como se describe en materiales y métodos. Diferencia significativa: \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

Una posible explicación para el hecho de que la represión por hemina sobre el gen del PSA se observa aún cuando eliminamos parcialmente a STAT3 del sistema celular, es que HO-1 también participa en la represión de otras vías de transducción alternativas a STAT3, como por ejemplo NF $\kappa$ B (Ferrando et al. 2011), las cuales tienen relevancia en la activación del AR (Zhang L. et al. 2009).

### VI.3 HO-1 disminuye la co-localización de STAT3 y AR

En base a los resultados previos, los cuales demuestran que HO-1 reduce la señalización de STAT3, nos propusimos estudiar si AR y STAT3 co-localizan en el núcleo de las células cuando éstas son tratadas con testosterona y estimuladas con IL-6 y examinar cómo se modifica esta disposición bajo la inducción de HO-1.

Realizamos ensayos de microscopía confocal utilizando anticuerpos primarios específicos para cada proteína en células LNCaP tratadas con IL-6 para estimular a STAT3 y con testosterona para activar al AR. Con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos evaluamos la co-localización de STAT3 (Alexa Fluor 488, verde) y AR (Alexa Fluor 555, rojo). Las imágenes de la figura 45 A muestran la localización nuclear de AR inducida por la hormona y la de STAT3 estimulada por la citoquina. Un alto grado de co-localización entre las señales de STAT3 (verde) y AR (rojo) fue observado cuando se realizó el Merge de las imágenes (amarillo). Sin embargo, una disminución significativa en la co-localización nuclear de STAT3 y AR se detectó cuando las células fueron expuestas a hemina, lo cual podría asignarse a la retención citoplasmática de STAT3 en las células bajo inducción de HO-1 (Fig. 45 A). Mediante un análisis cuantitativo de la co-localización para estimar el grado de solapamiento de las señales de fluorescencia, también evidenciamos una disminución significativa en los valores del coeficiente de Manders relativo a los controles no tratados con hemina ( $0,88 \pm 0,01$  vs  $0,91 \pm 0,01$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 25$  células, Fig. 45 B). El mapa de co-localización, el cual muestra el producto de las diferencias en las medias de intensidad para cada fluorocromo (Fig. 45 C, panel superior) permite ver la localización principalmente nuclear de ambas proteínas en ausencia de hemina. Sin embargo, de manera coherente con lo demostrado en las secciones anteriores la inducción de HO-1 disminuyó la co-localización de STAT3 y AR, como puede apreciarse en el mapa de co-localización (Fig. 45 C, panel inferior). En la figura 45 D los gráficos de dispersión reflejan como ambas proteínas se encuentran juntas en el tratamiento control, lo cual se evidencia como un ángulo cercano a  $45^\circ$ , y ocurre una disminución en la co-localización mediante la inducción de HO-1, mostrado como un aumento de la dispersión respecto a esta línea de ajuste de  $45^\circ$ .



**Figura 45.** *HO-1* disminuye la co-localización nuclear de AR y STAT3 en la línea celular LNCaP.

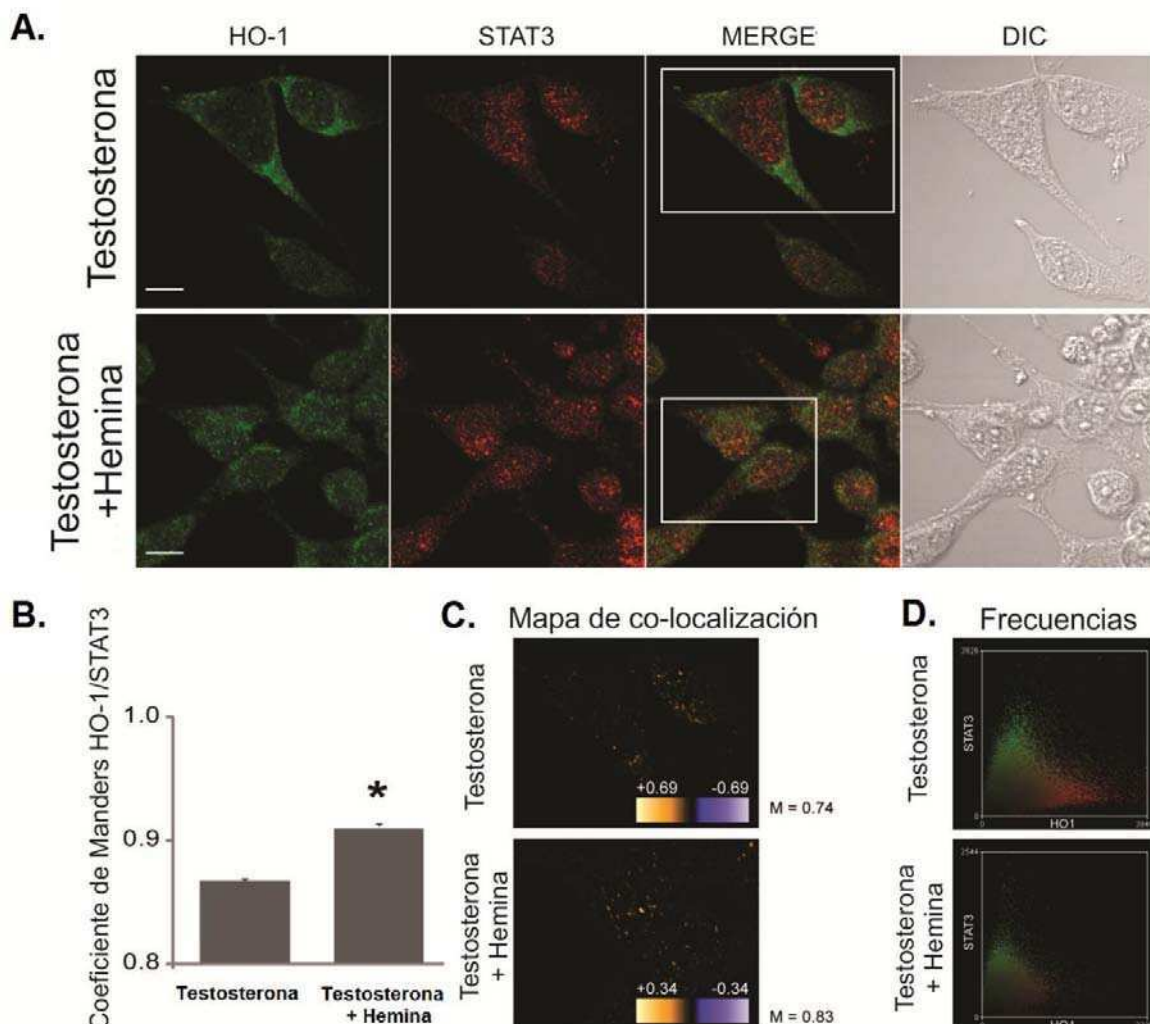
Las células LNCaP cultivadas en medio libre de rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas fueron estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) y testosterona (10  $\mu\text{M}$ , 24 h) en ausencia o presencia de hemina (80 mM, 24 h). Las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo primario anti-STAT3 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (fluorescencia verde) y con un anticuerpo primario anti-AR y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 555 (fluorescencia roja). A) Se analizó la co-localización de STAT3 y AR por microscopía confocal. El grado de solapamiento de los canales verde y rojo se observa en amarillo el panel Merge. B) Se calculó el coeficiente de Manders (STAT3/AR) en células individuales, Diferencia significativa: \*  $P < 0.05$ . C) Mapa de co-localización. D) La frecuencia de dispersión se calculó mediante el programa imageJ con un plug-in de análisis de correlación de intensidades (canal1 Alexa Fluor 488; canal2 Alexa Fluor 555). Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Considerando la menor co-localización nuclear detectada en presencia de hemina entre AR y STAT3 y a fin de validar si dicho efecto se debe a la retención de STAT3 en el citoplasma, analizamos la distribución celular de STAT3 y HO-1, en las mismas condiciones experimentales. Realizamos ensayos de microscopía confocal utilizando anticuerpos primarios específicos para cada proteína en células LNCaP. Con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos evaluamos la co-localización de STAT3 (Alexa Fluor 555, rojo) y de AR (Alexa



Fluor 488, verde). Observamos que STAT3 y HO-1 exhiben un mayor grado de co-localización citoplasmática en presencia de hemina respecto al control (Fig. 46 A). Este mayor grado de co-localización se corroboró mediante el coeficiente de Manders que mostró un significativo aumento en sus valores respecto al control no tratado con hemina ( $0.90 \pm 0.01$  vs  $0.86 \pm 0.01$ ,  $P < 0.001$ ;  $n = 21$  células) (Fig. 46 B). Estos datos también se comprobaron al analizar el mapa de co-localización y la frecuencia de dispersión (Fig. 46 C y D). Estos resultados coinciden con los experimentos de inmunofluorescencia mostrados en la sección III.3 y en la figura 32.

Así confirmamos nuestra hipótesis que HO-1 interrumpe la vía de activación de AR en presencia de hormona favoreciendo la retención citoplasmática de STAT3, bloqueando su señalización y especulamos que esto impediría la interacción entre AR y STAT3.



**Figura 46.** Hemina aumenta la co-localización citoplasmática de STAT3 y HO-1 en la línea celular LNCaP.

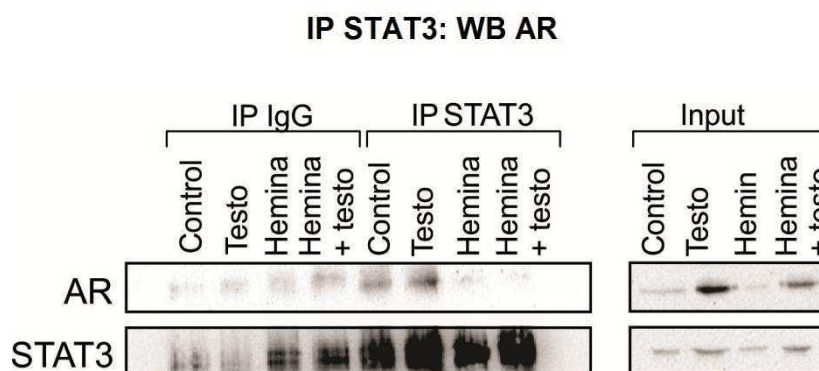
Las células LNCaP cultivadas en medio libre de rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas fueron estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) y testosterona (10  $\mu$ M, 24 h) en ausencia o presencia de hemina (80 mM, 24 h). Las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo primario

anti-HO-1 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (fluorescencia verde) y con un anticuerpo primario anti-STAT3 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 555 (fluorescencia roja). A) Se analizó la co-localización de STAT3 y HO-1 por microscopía confocal. El grado de solapamiento de los canales verde y rojo se observa en amarillo el panel Merge. STAT3 se observa en verde (Alexa Fluor 488), AR se observa en rojo (Alexa Fluor 555) y la co-localización nuclear (amarillo) se muestra en los paneles Merge. B) Se calculó el coeficiente de Manders (STAT3/HO-1) en células individuales. Diferencia significativa: \*  $P < 0,001$ . C) Mapa de co-localización. D) La frecuencia de dispersión se calculó mediante el programa imageJ con un plug-in de análisis de correlación de intensidades (canal 1: Alexa Fluor 488; canal 2: Alexa Fluor 555). Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

#### VI.4 HO-1 disminuye la asociación entre STAT3 y AR

Previamente se describió en la línea celular LNCaP una asociación entre STAT3 y AR cuando las células eran tratadas con IL-6 y testosterona y la consecuente activación de los elementos de respuesta al AR (Aaronson et al. 2007). En base a estos antecedentes y a los resultados de los estudios de co-localización anteriormente expuestos, nos propusimos investigar si la inducción de HO-1 podía alterar la asociación entre ambas proteínas.

Para ello llevamos a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en células LNCaP estimuladas con IL-6 y expuestas a testosterona, hemina o ambos tratamientos combinados. Las células controles se trataron con los respectivos vehículos. La inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo específico anti-STAT3 y se evaluó la asociación entre STAT3 y AR mediante análisis de Western blot. Evidenciamos la interacción entre ambos factores en la condición control y bajo estímulo con testosterona. La presencia de hemina claramente bloqueó dicha interacción en las células cultivadas en presencia o ausencia de testosterona (Fig. 47).



**Figura 47.** La inducción de HO-1 bloquea la asociación de STAT3 y AR en la línea celular LNCaP.

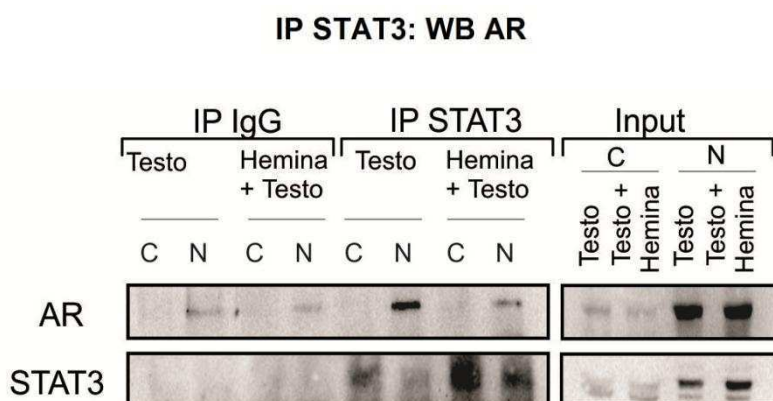
Se realizaron lisados de proteínas totales extraídas de células LNCaP cultivadas en medio sin rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas, estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 30 min) y tratadas con testosterona (10  $\mu\text{M}$ , 24 h), hemina (80 mM, 24 h), ambos o sus respectivos vehículos (control). Se inmunoprecipitaron (IP) 500  $\mu\text{g}$  de proteínas provenientes de estos extractos con un

anticuerpo policlonal anti-STAT3 o IgG como control negativo. Los inmunocomplejos se analizaron por Western blot con los anticuerpos indicados. Una fracción de los extractos proteicos (10%) fue revelada para las proteínas estudiadas con el fin de controlar la eficiencia de la técnica (input). Este experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Conforme a estos resultados podemos inferir que AR y STAT3 presentan una menor interacción cuando la expresión de HO-1 está inducida en el entorno celular.

Con el objetivo de detectar con más detalle si esta disminución en la asociación de ambas proteínas impactaba en las vías de transducción de señales ejecutadas por los dos factores de transcripción, nos propusimos analizar si la reducción de la interacción entre AR y STAT3 ocurría en el compartimiento nuclear de las células.

Para responder a este interrogante efectuamos ensayos de co-immunoprecipitación en extractos nucleares y citoplasmáticos de células LNCaP, en condiciones experimentales en las que ambos factores se encuentran activados mediante estimulación con testosterona y con IL-6 en presencia o ausencia de hemina. La inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo específico anti-STAT3 y se evaluó la asociación entre STAT3 y AR mediante análisis de Western blot. Los resultados presentados en la figura 48 demostraron que existía una fuerte interacción entre ambas proteínas en la fracción nuclear, cuando las células estimuladas con IL-6 fueron expuestas a hormona. Es interesante resaltar que el tratamiento con hemina claramente redujo esta asociación en la fracción nuclear.



**Figura 48.** La inducción de HO-1 provoca una fuerte reducción de la interacción nuclear de STAT3 y AR en la línea celular LNCaP.

Se realizaron extracciones de proteínas de las fracciones nuclear y citoplasmática de células LNCaP cultivadas en medio sin rojo fenol suplementado con suero deprivado de hormonas, estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 30 min) y tratadas con testosterona (10  $\mu$ M, 24 h), hemina (80 mM, 24 h), ambos o sus respectivos vehículos (control). Se inmunoprecipitaron (IP) proteínas (250  $\mu$ g) provenientes de las fracciones nucleares (N) y citoplasmáticas (C) con un anticuerpo policlonal anti-STAT3 o IgG como control negativo. Los inmunocomplejos se analizaron por Western blot con los anticuerpos indicados. Una fracción de los extractos proteicos (10%) fue revelada para las proteínas estudiadas con el fin de

controlar la eficiencia de la técnica (input). Este experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Los resultados mostrados anteriormente en conjunto nos permiten concluir que HO-1 altera la localización y por ende la señalización de STAT3. Esto trae aparejado una reducción en la co-activación del AR por STAT3, que se manifiesta por la represión de su gen blanco específico, el PSA. Finalmente podemos inferir que estos hallazgos son producto de la interferencia en la asociación física entre ambos factores en el núcleo, provocada por la inducción de HO-1.

## **VII. EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE HO-1 EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NFκB**

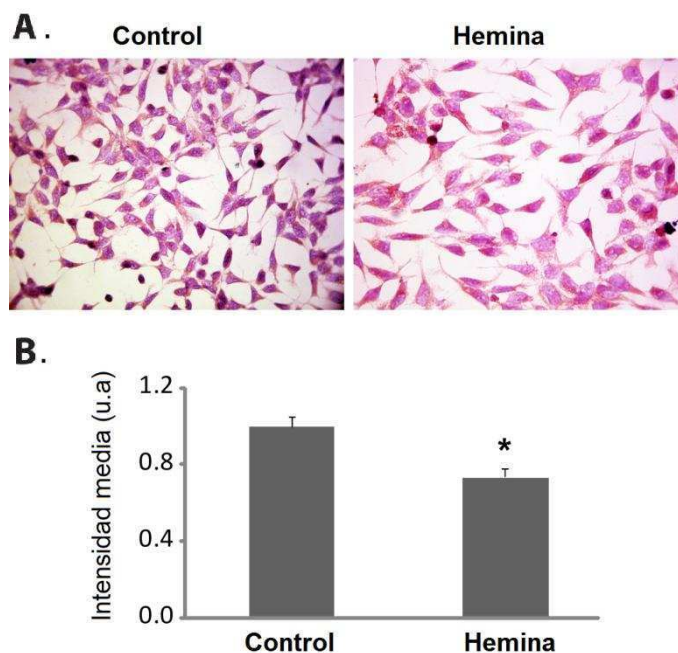
La inflamación ha sido descrita como un agente etiológico importante en el PCa permitiendo el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas que conllevan al desarrollo del adenocarcinoma (De Marzo et al. 2007) y que podrían contribuir a la transición del PCa hacia la enfermedad resistente a la castración (CRPC) (Gueron et al. 2012).

Entre las señales que participan en este ambiente inflamatorio, encontramos que la vía de NFκB constituye un punto clave en la asociación de la inflamación y el cáncer (Gueron et al. 2012).

En nuestro laboratorio demostrado previamente que la sobre-expresión de HO-1 reprime la vía de NFκB, induciendo la acumulación de IκB (inhibidor de NFκB) y disminuyendo los niveles de IKK (quinasa de IKB) en líneas celulares de PCa (Ferrando et al. 2011). Además NFκB está involucrado tanto en la activación del AR (Zhang L. et al. 2009) y en consecuencia del PSA (Chen C. D. y Sawyers 2002), como en su interacción con STAT3 (Grivennikov y Karin 2010). Recientemente se propuso que STAT3 se requería para la correcta inducción de IL-6 por NFκB demostrando que ambos factores co-existían en complejos nucleares y que STAT3 participaba en la retención de NFκB en el núcleo celular (Yoon et al. 2012). En base a estas observaciones nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la inducción de HO-1 altera la localización de NFκB, lo cual justificaría la modulación negativa de la vía de NFκB y a su vez incrementaría el efecto represivo sobre STAT3 y su interacción con el AR.

### VII.1 HO-1 disminuye la expresión de p65 en células de PCa sensibles a andrógenos

Considerando que previamente demostramos que HO-1 reprime la señalización de STAT3 modificando su localización subcelular, decidimos analizar por inmunocitoquímica la distribución de p65, la subunidad activa de NFκB, en células LNCaP tratadas con IL-6, en presencia o ausencia de hemina. La inducción de HO-1 por hemina produjo una significativa disminución en la expresión de p65 (Fig. 49).



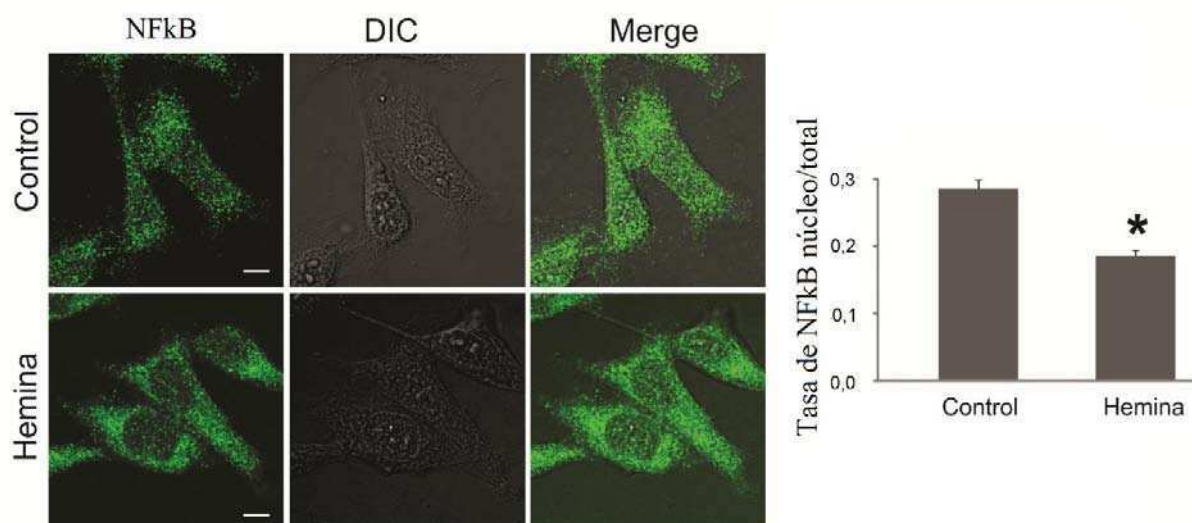
**Figura 49.** Inmunocitoquímica de la expresión de p65 en la línea celular LNCaP.

Las células LNCaP se cultivaron en presencia de IL-6 (10 ng/ml) y se trataron o no con hemina (80 mM, 24 h). Las células se fijaron con metanol. Se estudió por inmunocitoquímica la distribución celular de p65. Magnificación final 400x. Se cuantificó la inmuno-reactividad diferencial de p65 normalizada a la condición control. Se calculó la media  $\pm$  SD. Diferencia significativa: \*  $P < 0,05$ .

### VII. 2 HO-1 reduce la localización nuclear de p65 en células de PCa insensibles a andrógenos

En base a lo observado nos propusimos analizar el efecto de la inducción de HO-1 sobre la distribución de p65 en otra línea celular de PCa. Para ello realizamos experimentos de microscopía confocal en células PC3 expuestas a IL-6 y tratadas en ausencia o presencia de hemina. Se realizó la inmunomarcación con un anticuerpo primario específico anti-p65 y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 555 (verde). NFκB se detectó en núcleo y citoplasma en las células crecidas en condiciones controles. Bajo tratamiento con

hemina se comprobó una clara retención citoplasmática de p65 (Fig. 50, panel izquierdo). La cuantificación de la tasa de localización de NFκB nuclear demostró una significativa reducción respecto a su distribución total en las células con inducción de HO-1 (Fig. 50, panel derecho).



**Figura 50.** *HO-1 retiene a p65 en el citosol en la línea celular PC3.*

Se estudió por microscopía confocal la distribución de p65 en células PC3 estimuladas con IL-6 (10 ng/ml, 24 h) y tratadas en ausencia o presencia de hemina (80 mM, 24 h). p65 se observa en verde (Alexa Fluor 555) y el contorno celular en DIC (Differential-Interference Contrast). La segmentación de la célula entera y el núcleo fue realizada para calcular la tasa de NFκBn/NFκBt en un análisis célula a célula. Se muestra una imagen representativa de cada grupo. Barra de escala: 10 μm.

Estos resultados nos sugieren que la inducción de HO-1 atenuó los niveles de p65 en las células sensibles a hormona e indujo su retención citoplasmática en células insensibles a andrógenos, en ambos casos bajo el estímulo de IL-6.

En resumen, estos resultados nos muestran que HO-1 es capaz de modular por lo menos dos caminos de señalización involucrados en la carcinogénesis prostática e inflamación y cuya acción conjunta o individual puede co-regular al AR.

## **DISCUSIÓN**

---

El PCa es una enfermedad cuya mortalidad está asociada al desarrollo de las metástasis; desafortunadamente muchos de los pacientes se presentan al momento del diagnóstico con la enfermedad diseminada. La terapia de elección para estos pacientes es la ablación hormonal. En una primera etapa tanto el tumor como las metástasis regresionan, sin embargo, la mayoría de los pacientes presentan una recurrencia de la enfermedad en un período comprendido entre los 12 y los 18 meses (Narayanan et al. 2010). Esto ocurre porque inicialmente las células de cáncer, al igual que las células normales de la próstata, requieren de los andrógenos para sobrevivir y proliferar; no obstante, existen múltiples mecanismos que le permiten al tumor evolucionar a un estado en que no requiere de las hormonas para crecer. Uno de dichos mecanismos implica la activación de otras vías de señalización que pueden estimular al AR y en consecuencia la transcripción regulada por el mismo, incluso en ausencia de andrógenos (Mostaghel y Nelson 2008; Culig y Santer 2012). La comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la activación del AR constituye un punto clave en el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad.

La transcripción mediada por el AR requiere de la formación de un complejo activo a través del reclutamiento de varios co-activadores y factores de transcripción (Roy et al. 2001). A su vez, la intensidad y la selectividad de las reacciones de transcripción dependen de la presencia de los co-reguladores, los cuales son críticos para la función de un gen en un tejido específico (Lonard y O'Malley B 2007; O'Malley y Kumar 2009). Además estos co-activadores regulan una variedad de procesos biológicos fuera del núcleo tales como la traducción del ARNm, la función mitocondrial, la invasión y la motilidad (Lonard y O'Malley B 2007). Las citoquinas participan de la modulación de la activación del AR y por ende del crecimiento y de la diferenciación del PCa (Chun et al. 2009).

La inflamación crónica juega un rol esencial en las alteraciones que dirigen la progresión de esta enfermedad. La secreción de mediadores inflamatorios, principalmente la citoquina pro-inflamatoria IL-6, en el microambiente tumoral estimula vías muy importantes como la de STAT3 y la de NFκB, que favorecen la supervivencia de las células tumorales así como la resistencia a la castración (Bollrath y Greten 2009; Shodeinde y Barton 2012).

El daño oxidativo tiene una función central en la carcinogénesis prostática (Aydin et al. 2006). La generación de ROS se encuentra estrechamente asociada a la inflamación y a la transformación maligna (De Marzo et al. 2007). Así, el estrés oxidativo provocado por la célula tumoral altera el microambiente que la rodea probablemente induciendo cambios post-traduccionales en ciertos co-reguladores con diferentes funciones compartimentales (Lonard y O'Malley B 2007; O'Malley y Kumar 2009).



La inducción de HO-1 y los productos de su actividad enzimática representan un evento clave en la respuesta celular a insultos pro-oxidativos y pro-inflamatorios (Jozkowicz et al. 2007). Esta proteína participa en el mantenimiento de la homeostasis celular reduciendo la injuria oxidativa, atenuando la inflamación y regulando la proliferación (Grochot-Przeczek et al. 2012). Los niveles basales de expresión de HO-1 varían entre las diferentes células y tejidos y se ha propuesto que actúa como un biosensor regulando el destino celular (Wegiel et al. 2008). La gravedad de la falta de expresión de esta proteína citoprotectora se pone de manifiesto en un modelo genético de ratones HO-1<sup>-/-</sup>, en los cuales la ausencia de la misma se asocia con severas anormalidades en el sistema inmune y con el desarrollo de un fenotipo inflamatorio crónico (Poss y Tonegawa 1997). Estos animales presentan dificultades para resolver infecciones y otras patologías, revelando así su función en el control de la homeostasis celular (Soares y Bach 2009; Paine et al. 2010). En humanos la deficiencia de HO-1 prácticamente no ocurre; se reportaron solo dos casos de esta condición genética (Yachie et al. 1999; Radhakrishnan et al. 2011). En contraste los ratones transgénicos para HO-1 se encuentran protegidos de la inflamación, de la disfunción vascular y de la formación de tejidos fibróticos post-infarto (Wang G. et al. 2010). Además la sobre-expresión de HO-1 contrarresta los efectos citotóxicos pro-oxidativos y pro-inflamatorios causados por el hemo, vía la represión de la expresión de moléculas pro-inflamatorias como citoquinas y moléculas de adhesión e impidiendo de este modo el influjo leucocitario (Lundvig et al. 2012).

Se demostró que HO-1 se expresa en diferentes tipos de tumores, tales como linfossarcoma, adenocarcinoma de mama y pulmón, hepatoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células escamosas, cáncer de páncreas y tumores cerebrales (Jozkowicz et al. 2007). Sin embargo, existen opiniones contradictorias sobre el rol de HO-1 en la carcinogénesis; su efecto parece depender del tipo de tumor (Jozkowicz et al. 2007; Grochot-Przeczek et al. 2012).

Trabajos anteriores realizados por nuestro laboratorio y por otro grupo de investigación han asociado a HO-1 con la carcinogénesis prostática (Maines y Abrahamsson 1996; Sacca et al. 2007). Previamente documentamos que la inducción de HO-1 en células de PCa provoca su translocación nuclear e inhibe la proliferación celular *in vitro* y retarda el crecimiento tumoral *in vivo* (Gueron et al. 2009). Acorde a esos resultados, en este trabajo de tesis demostramos que las células PC3 que sobre-expresan HO-1 presentan un arresto del ciclo celular en la fase G2/M, que se corroboró por la disminución de la expresión del marcador de progresión del ciclo E2F1 y de la Ciclina A, involucrada en la transición de la fase S, y el aumento de las proteínas inhibitorias del ciclo celular, p21<sup>CIP1/WAF1</sup> y p27<sup>Kip1</sup> (Fig. 22 y 23). Resultados

similares sobre el perfil de inducción de p21<sup>CIP1/WAF1</sup> en respuesta a la sobre-expresión de HO-1 también fueron reportados en células mesangiales glomerulares y en células del músculo liso pulmonar (Kumar D. et al. 2010; Li M. et al. 2012). En concordancia con los datos presentados en esta tesis, Kitano y colaboradores (Kitano et al. 2012) comprobaron que un análogo de la vitamina K, provocaba arresto mediado por la inducción de HO-1 en la misma fase del ciclo en células de neuroblastoma. No obstante, Hu y colaboradores (Hu et al. 2013) recientemente demostraron que en células de carcinoma esofágico el arresto en G2/M, inducido por inhibidores de las vías de p38 MAPK y mTOR, estaba asociado a la disminución en los niveles de HO-1. Estos resultados contradictorios pueden deberse a que el efecto regulatorio que HO-1 ejerce sobre distintos procesos celulares depende del tipo de célula y del tipo de tejido (Loboda et al. 2008; Grochot-Przeczek et al. 2012; Gueron et al. 2012). También debe considerarse que la función de HO-1 podría estar condicionada por las múltiples modificaciones genéticas y la alteración que ellas producen en el microambiente tumoral (Wegiel et al. 2008; Grochot-Przeczek et al. 2012).

Teniendo en cuenta que los andrógenos y el AR son críticos para la proliferación de las células de próstata (Zhu y Kyprianou 2008), en este trabajo nos propusimos estudiar el efecto de HO-1 en la vía de señalización del AR, por su importancia como factor de proliferación en el PCa. Los resultados obtenidos demuestran por primera vez que la inducción de HO-1 reprime la transcripción del PSA en las células de PCa (Fig. 24-26), lo cual indica que HO-1 estaría interrumpiendo la señalización del camino del AR.

Generalmente se acepta que la represión en la transcripción del PSA es consecuencia de la reducción en la expresión del AR (Han H. Y. et al. 2008; Wang X. L. et al. 2011) o de la disminución de su translocación nuclear (Stan y Singh 2009; Darshan et al. 2011) en respuesta a diferentes estímulos. Sin embargo, nuestros resultados comprueban que el mecanismo de interrupción de la señalización del AR por inducción de HO-1 no se debe a cambios en los niveles del AR ni en su translocación nuclear (Fig. 27 y 28). También demostramos que no existe una interacción física directa entre HO-1 y el AR (Fig. 30). En conjunto estas observaciones nos llevaron a investigar el mecanismo molecular por el cual HO-1 disminuye la activación del AR.

Nuestro grupo de investigación previamente demostró la expresión nuclear de HO-1 en carcinomas humanos primarios de próstata naive de tratamiento (Sacca et al. 2007). En líneas celulares de PCa confirmamos que la sobre-expresión de HO-1 regula su localización nuclear (Gueron et al. 2009). De este modo, además de su función citoprotectora frente al estrés celular y la inflamación, los procesos en los que participa HO-1 son cada vez más numerosos y

más distantes del rol anti-inflamatorio y anti-oxidante que se atribuye a los productos de su actividad catalítica. Si bien hay pocos trabajos en los que se propone una función nuclear para HO-1, diferente a la degradación del hemo que ocurre en el citoplasma, actualmente en la bibliografía permanentemente aparecen más publicaciones que le asignan a esta proteína una función relacionada a la regulación de la expresión génica. Entre ellos el grupo de Dennerly (Lin Q. et al. 2007) propone que HO-1 podría regular la transcripción de genes, incluso su propia transcripción (Lin Q. S. et al. 2008). El grupo de Dulak comprobó que HO-1 es capaz de regular subpoblaciones de miRNA modificando patrones de diferenciación celular (Kozakowska et al. 2012). Recientemente el grupo de Raimondo determinó que el efecto protector de HO-1 sobre la citotoxicidad inducida por Imatinib (inhibidor de la quinasa Abl) no involucra a los sub-productos de HO-1 sino a su translocación nuclear seguida de clivaje proteolítico (Tibullo et al. 2012). En el campo del cáncer, nuestro grupo de investigación fue el primero en documentar la localización nuclear de HO-1 (Sacca et al. 2007). También mostramos que la inducción farmacológica o genética de HO-1 inhibe la proliferación, la migración y la invasión celular (Gueron et al. 2009). Además, la inoculación s.c. de las células PC3HO-1 en ratones nu/nu retardó el crecimiento tumoral y estos tumores presentaron menos vascularización, con vasos sanguíneos de menor densidad que los controles y con expresión disminuida de genes inflamatorios y angiogénicos como Angiopoyetina1, Factor tipo angiopoyetina 3, CXCL (quimoquinas motivo C-X-C) 1, CXCL3, CXCL10 y CXCL5, VEGF-D, IL-6, IL8, MMP9, trombospodina1 y VEGF-A (Gueron et al. 2009; Ferrando et al. 2011). El grupo de Curino-Facchinetti también detectó la localización nuclear de HO-1 en otros tipos de tumores, como en cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (Gandini et al. 2012) y en carcinoma de células pequeñas de pulmón (Degese et al. 2012). Más aún, en simultáneo con la escritura de este manuscrito se determinó en nuestro laboratorio y en colaboración con el MD Anderson Cancer Center que tumores derivados de células PC3HO-1 creciendo en el fémur de ratones SCID también presentaban inmunorreactividad positiva nuclear de HO-1 (Ferrando 2013). Asimismo esta particular localización se encontró en un microarray de tumores humanos de próstata resistentes a la castración creciendo como xenotransplantes subcutáneos en ratones SCID (Ferrando 2013). En resumen, a través de los diferentes modelos experimentales utilizados por nuestro grupo podemos asegurar que la localización nuclear de HO-1 obedece a un fenómeno biológico finamente regulado por ciertos estímulos celulares y no es el resultado de eventos que ocurren al azar.

Cabe destacar que en este trabajo de tesis mediante la técnica de ChIP demostramos por primera vez que HO-1 se asocia a los promotores de genes implicados en la angiogénesis y

la progresión del PCa como MMP9, uPA y PSA (Fig. 29), sugiriendo así un nuevo rol nuclear para HO-1, como un posible co-regulador de la transcripción. Hallazgos de nuestro laboratorio previos a esta tesis, mostraron que la inducción de HO-1 reprime la expresión e inhibe la actividad de MMP9 *in vitro* e *in vivo* (Gueron et al. 2009; Ferrando et al. 2011). Posteriormente, otro grupo publicó también que la expresión de HO-1 media la represión de MMP9 en cáncer de mama (Chen H. W. et al. 2013). Es de destacar en base a los datos obtenidos del ChIP, que los productos proteicos de los tres genes que reclutan a HO-1 en su promotor cumplen funciones directamente relacionadas a la carcinogénesis prostática (Rabbani et al. 2010; Williams et al. 2011; Kwon et al. 2012; Gupta et al. 2013).

Como mencionamos, un hallazgo importante de esta tesis es la clara regulación de la expresión del PSA que observamos en respuesta a la inducción de HO-1 en cultivos de PCa (Fig. 24-26). Sin embargo, como HO-1 no posee en su secuencia dominios de unión al ADN y por lo tanto no puede unirse directamente a promotores génicos, necesitaría asociarse a factores de transcripción que si lo hagan. En la actualidad no hay trabajos en los que se reporte que HO-1 puede interactuar con proteínas reguladoras de la transcripción en tumores y creemos que la identificación de dichos factores y la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados, es un objetivo central para nuestras investigaciones sobre la carcinogénesis prostática.

STAT3 es un factor de transcripción que afecta la supervivencia celular, el metabolismo, el crecimiento, la diferenciación y la migración en múltiples órganos (Levy y Lee 2002), y se ha informado que cumple un rol en la reparación epitelial (Ridley et al. 2003). Además, el papel de STAT3 en la migración celular se ha demostrado en varios modelos experimentales (Yamashita et al. 2004), afectando la motilidad celular a través de caminos transcripcionales y no transcripcionales (Ridley et al. 2003; Silver et al. 2004).

En el PCa avanzado, STAT3 se encuentra constitutivamente activo y el aumento de la expresión de pSTAT3 en los pacientes se correlaciona con una mayor severidad de la enfermedad y con un menor tiempo de supervivencia (Mora et al. 2002; Tam et al. 2007). La activación constitutiva de STAT3 se cree que es una consecuencia de los niveles circulantes incrementados de IL-6 detectados en pacientes con PCa refractario a hormonas (Drachenberg et al. 1999). Basándonos en estos antecedentes exploramos si HO-1 interactuaba con este factor. Mediante técnicas de co-inmunoprecipitación, determinamos que HO-1 interactúa con STAT3 en células de PCa (Fig. 31). La importancia del hallazgo de la interacción entre el factor de transcripción y la proteína anti-inflamatoria, nos lleva a pensar que HO-1 podría asociarse a otros factores de transcripción y así se uniría a promotores génicos regulando

procesos nucleares. Pero fundamentalmente nos conduce a concluir que esta interacción entre HO-1 y STAT3 revela un mecanismo que sustenta la acción anti-tumoral de HO-1 descrita previamente por nuestro grupo (Gueron et al. 2009; Ferrando et al. 2011) y confirmada en esta tesis.

Dado que la inflamación es un componente crítico del crecimiento tumoral y la progresión (Bonicchi et al. 2011), el control de los mediadores de la inflamación juega un papel crucial en el desencadenamiento y avance de la malignidad (Gueron et al. 2011). En trabajos anteriores demostramos que la sobre-expresión de la HO-1 se correlaciona con una reducción de los niveles de factores pro-inflamatorios y pro-angiogénicos (Gueron et al. 2009; Ferrando et al. 2011). Entre ellos la expresión de IL-6 se encontró disminuida en células de PCa con mayores niveles de HO-1 (Gueron et al. 2009). La IL-6 se une a los receptores transmembrana gp130 y señala a través de las quinasas JAK para fosforilar y activar al factor de transcripción STAT3 (Chang et al. 2010). Este factor desempeña funciones en diversos procesos celulares y es necesario para la embriogénesis normal en el ratón (Mohr et al. 2012). Como se mencionó anteriormente además está involucrado en la progresión tumoral del PCa y en la inflamación asociada al escape tumoral (Yu et al. 2009).

Considerando los antecedentes mencionados, en el presente trabajo decidimos investigar el efecto de HO-1 en la señalización de la vía de STAT3. Para cumplir con este objetivo analizamos la localización celular de STAT3 bajo inducción de los niveles de HO-1 en las células de PCa y en tumores que sobre-expresan HO-1 creciendo como xenotransplantes en ratones nu/nu. Nuestros resultados demuestran claramente que el aumento de HO-1 provoca la retención citoplasmática de STAT3, tanto in vivo como in vitro (Fig. 34, 35, 39 y 41).

Utilizando otros compuestos anti-tumorales también se reportó en el PCa el efecto inhibitorio del crecimiento mediado por la disminución de la translocación nuclear de STAT3. Se comprobó que el Sulforafano, un agente derivado del brócoli, inhibe la viabilidad de las células de PCa y previene el desarrollo de tumores y las metástasis en sitios distantes en un modelo murino transgénico. Estos autores demostraron que dicho compuesto inhibía la activación de STAT3 inducida por IL-6 y que este efecto provocaba la apoptosis de las células cancerígenas (Hahm y Singh 2010). Del mismo modo el dialiltrisulfuro, un compuesto derivado del ajo, disminuye la translocación nuclear de STAT3 y la expresión de sus genes blanco en el PCa (Chandra-Kuntal y Singh 2010). En otros tipos de tumores el bloqueo de la señalización de STAT3 también es responsable del control del crecimiento de las células tumorales. Por ejemplo, en el cáncer de ovario el 3,3'-Diindolilmetano, presente en vegetales crucíferos, inhibe la migración y la formación de estructuras vasculares por supresión de la

señalización de STAT3, como consecuencia de la menor translocación nuclear de este factor (Kandala y Srivastava 2012).

De acuerdo con estas publicaciones, los resultados de los estudios *in vitro* llevados a cabo en esta tesis muestran que la disminución en la localización nuclear de STAT3 causada por sobre-expresión de HO-1, también se asocia a una señalización atenuada de STAT3 en el PCa, reflejada a través de la represión de sus genes blanco bajo inducción con IL-6 (Fig. 36 y 37). Entre los genes diana de STAT3 se encuentran genes involucrados en la progresión del ciclo, en la angiogénesis, en la metástasis y en la señalización anti-apoptótica. Estos incluyen a Ciclina D1, VEGF, Bcl xL, Survivina, uPA, MMP9. La regulación positiva de estos genes en el cáncer está bien documentada (Shodeinde y Barton 2012) y por este motivo la interrupción en el camino de señalización de STAT3 surge como una estrategia novedosa para el diseño de terapias contra esta patología (Shodeinde y Barton 2012; McFarland et al. 2013).

El eje HO-1/STAT3 también cumple un rol crítico en otras enfermedades como la lesión pulmonar, el daño por isquemia/reperfusión (IRI) y la malaria. Se propone que ambos tanto HO-1 como el monóxido de carbono, requieren de STAT3 endotelial para ejercer sus efectos preventivos frente al daño. A su vez STAT3 confiere protección a las células endoteliales mediante mecanismos dependientes e independientes de HO-1. Aparentemente existiría un sistema de retroalimentación positiva entre STAT3 y HO-1, en el cual STAT3 activa a HO-1, lo cual conduce a la producción de monóxido de carbono, que a su vez activa a STAT3. Estas observaciones marcan una interdependencia entre HO-1 y STAT3. La especulación radica, en que la presencia de este sistema aseguraría la activación óptima de dos vías de señalización protectoras vitales mediadas por HO-1 y STAT3, optimizando así la defensa contra la lesión pulmonar letal (Zhang X. et al. 2006).

Este eje también está implicado en la regulación de la respuesta inmune innata en el hígado en condiciones de IRI, alterando la señalización de PI3K/PTEN, modulando PI3K/Akt y por lo tanto, proporcionando una retroalimentación negativa sobre la inflamación mediada por el receptor tipo Toll 4 del sistema inmune innato. Estos resultados establecen nuevas bases para el tratamiento terapéutico de la inflamación hepática y del IRI en los pacientes receptores de trasplantes (Ke et al. 2012). En el paludismo también se muestra una interesante interrelación entre HO-1, CXCL10/CXCR3 y STAT3, vinculando a estas moléculas en la patogénesis de esta enfermedad (Liu M. et al. 2012).

Durante los últimos años, el campo del cáncer ha sido testigo de cómo la regulación de la respuesta inmune tumoral ha dado un paso adelante en la inmunoterapia contra esta enfermedad. La comprensión de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la

activación de células del sistema inmune y al mantenimiento de la homeostasis podrían desentrañar la complejidad del proceso inmunológico del escape tumoral (Zwirner et al. 2010). En este contexto, HO-1 también podría estar involucrado en dicho escape, ejerciendo un rol protector en los procesos mediados por los linfocitos T efectores, tales como Th1, Th2 y Th17 (Xia et al. 2008). Más aún, la activación constitutiva de STAT3 tanto en células tumorales como en las diversas células del sistema inmune en el estroma tumoral, se demostró que inhibe la expresión de numerosos factores y moléculas necesarias para el rechazo tumoral. Dentro de estos factores encontramos CCL5, IL-12, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , INF $\beta$ , CLX10, CD40, CD80, CD86 y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Yu et al. 2007). Estos trabajos muestran la relevancia de la vía de HO-1/STAT3 como un eje interesante para la inmunoterapia del cáncer.

Nuestros resultados revelan que la inducción de HO-1 conduce a una asociación con STAT3 (Fig. 31) y a una retención de este factor en el citoplasma (Fig. 34, 35, 39 y 41). Este hecho está acompañado de una disminución en la señalización de STAT3 (Fig. 36 y 37). En este trabajo también demostramos la disminución en la actividad transcripcional del AR (Fig. 24-26). En base al conjunto de estas observaciones resultaba imperante estudiar el rol de la modulación en la vía de STAT3 en el contexto de la disminución de la señalización del AR.

En el PCa se sabe que la formación de complejos entre STAT3 y AR y la funcionalidad de los mismos está afectada por factores que conforman un loop regulatorio parácrino/autócrino, que activa diferentes cascadas de señalización (Aaronson et al. 2007). En este trabajo de tesis demostramos que HO-1 no se asocia directamente al AR (Fig. 30) pero que interactúa con STAT3 (Fig. 31). De esta manera HO-1 podría estar interrumpiendo la activación del AR como consecuencia de su efecto represor sobre la vía de STAT3

Durante la progresión del PCa, los tumores inicialmente responden a la ablación de andrógenos pero frecuentemente evolucionan hacia la resistencia a la castración (Dayyani et al. 2011) y se han identificado varios mecanismos que pueden mediar esta progresión (Devlin y Mudryj 2009). Uno de dichos mecanismos implica la activación de caminos de señalización alternativos que pueden encender al AR y en consecuencia la transcripción regulada por este receptor, incluso en ausencia de hormonas (Culig 2011). Entre ellos, está claramente documentado que la IL-6 se encuentra elevada con alta frecuencia en pacientes con carcinoma de próstata (Nakashima et al. 2000). Esta citoquina activa la señalización del AR en LNCaP, que como explicamos previamente es una línea celular sensible a andrógenos que expresa el receptor hormonal (Culig et al. 2002). Se propuso que la IL-6 influye en el crecimiento del tumor a través de efectos de señalización que generan un loop autócrino/parácrino (Culig et al.

2005; Aaronson et al. 2007), mediante la activación de la cascada JAK/STAT (Aaronson y Horvath 2002). Además se demostró que STAT3 está activado en los carcinomas de próstata (Mora et al. 2002).

La asociación física entre STAT3 y AR fue descrita en diferentes condiciones. De manera coincidente con nuestras observaciones, Matsuda y colaboradores (Matsuda et al. 2001) comprobaron que la interacción entre ambos factores requería la estimulación del AR por testosterona. En contraposición otros autores reportaron que dicha asociación dependía de la estimulación con IL-6, pero era independiente de la presencia hormonal (Chen T. et al. 2000; Aaronson et al. 2007). No obstante, se demostró que los andrógenos potencian la respuesta al eje IL-6/STAT3 (Ueda et al. 2002; Aaronson et al. 2007; Tam et al. 2007); de este modo ambas vías se mantienen activas en forma sinérgica. En la investigación abordada en esta tesis, se evaluó si HO-1 era capaz de provocar cambios en los niveles de los reguladores de transcripción o si afectaba las interacciones entre estos factores, lo cual en consecuencia podría modificar la comunicación entre diversas vías de señalización. Los cambios dinámicos en respuesta a estímulos extracelulares pueden ocurrir a través de varios mecanismos (Aaronson et al. 2007).

En este contexto, exploramos si HO-1 alteraba la activación del AR a través de la interrupción de la señalización de STAT3. Nuestros resultados nos permitieron comprobar que efectivamente el impacto negativo de HO-1 sobre la señalización del AR se debe a la perturbación que HO-1 provoca en la vía de STAT3. La sensibilización del AR a la testosterona en nuestro modelo depende de STAT3, porque la expresión de un dominante negativo de STAT3 o el silenciamiento de esta proteína reduce la respuesta del AR a la hormona (Fig. 42-44) y por el contrario la expresión ectópica de STAT3C aumenta la transcripción del PSA (Fig. 42 y 43). Más aún, demostramos que la inducción de HO-1 claramente reprime esta activación, interfiriendo con la señalización de STAT3 como se reflejó mediante la disminución de la expresión de genes blanco de esta vía (Fig. 36 y 37).

Como mencionamos anteriormente nuestros resultados de inmunoprecipitación revelan que no existe una asociación directa entre HO-1 y AR, sino que HO-1 interactúa con STAT3. Los estudios de microscopía confocal que realizamos en cultivos celulares estimulados con testosterona e IL-6 bajo tratamiento con hemina, permitieron comprobar que la colocalización nuclear de AR y STAT3, provocada por la activación de estos factores, se encontraba disminuida por la inducción farmacológica de HO-1 (Fig. 45) y que este efecto en parte se debía a la retención citoplasmática de STAT3 (Fig. 34, 35, 39 y 41). Mediante co-inmunoprecipitación confirmamos que la inducción de HO-1 disminuye la interacción entre



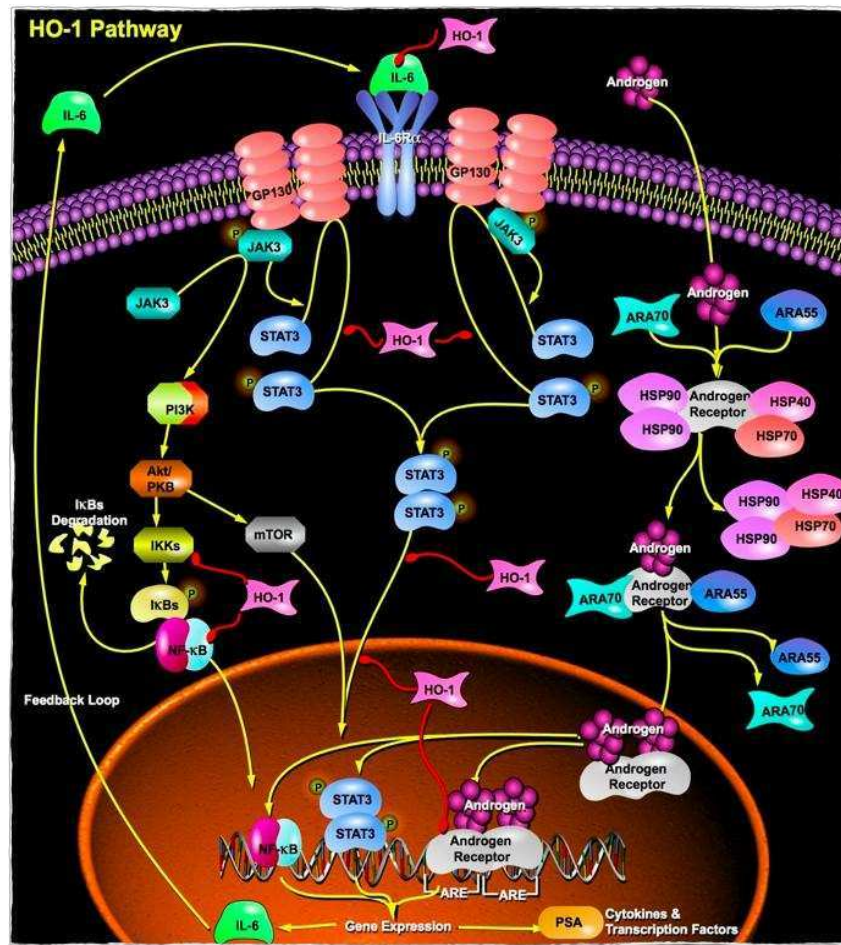
STAT3 y AR en el núcleo (Fig. 48). Estos datos brindan apoyo a nuestra hipótesis que propone que HO-1 está interfiriendo en la asociación entre AR y STAT3, afectando la funcionalidad del complejo activo formado entre ambas proteínas. En resumen, en presencia de hemina la retención citoplasmática de STAT3 disminuye su activación y su asociación con el AR y de este modo la inducción de HO-1 reprime la actividad transcripcional del receptor nuclear, afectando la tumorigenicidad de las células de PCa. Aunque en este trabajo demostramos claramente que HO-1 disminuye la activación mediada por STAT3 del AR en respuesta a andrógenos, cuando se reprimió o silenció STAT3 se continuó observando el bloqueo ejercido por HO-1 sobre la transcripción del PSA (Fig. 43 A y 44 B). Una posible explicación para la represión por hemina sobre el gen del PSA, que se mantiene aún cuando eliminamos parcialmente a STAT3 del sistema celular, es que HO-1 también participa en la represión de otras vías de transducción alternativas a STAT3 (Ferrando et al. 2011), las cuales tienen relevancia en la activación del AR (Zhang L. et al. 2009).

Los sistemas biológicos exhiben con frecuencia redundancia que puede explicar la respuesta alterada a diferentes factores. Por lo tanto, no podemos descartar que otras vías de señalización estén afectadas por HO-1, tales como la vía pro-inflamatoria de NFκB. Recientemente reportamos que la actividad anti-angiogénica de HO-1 en células de PCa es mediada por la interrupción de la señalización de NFκB (Ferrando et al. 2011). La inducción de HO-1 en células PC3 provocó la acumulación del inhibidor I kappa B (IκB), la disminución de los niveles de los transcriptos de la quinasa de IκB (IKK), y de esta manera promovió la formación del complejo por la unión de NFκB y su inhibidor, impidiendo así la activación de este camino de señalización (Ferrando et al. 2011). Varios genes involucrados en la tumorigénesis son regulados por STAT3 y NFκB, ya sea en forma sinérgica o individualmente. Recientemente se propuso que STAT3 es requerido para la inducción adecuada de IL-6 por NFκB, demostrando que ambos factores existen como complejos nucleares idénticos en el promotor proximal de IL-6 y que a su vez STAT3 participa en la retención nuclear de NFκB (Yoon et al. 2012). Estos hallazgos llevaron a los autores a sugerir que estos dos factores transcripcionales oncogénicos son activados simultáneamente por un mecanismo intrínseco durante condiciones de estrés de las células cancerosas, induciendo de forma cooperativa a diversos factores de supervivencia (Yoon et al. 2012). Cabe destacar además, como fue descrito previamente, que STAT3 también media la activación de la vía de NFκB en cáncer favoreciendo la acetilación del complejo RELA (p65)-p50 y promoviendo así la activación de la transcripción de genes pro-tumorales. Además de interactuar con la vía de STAT3, NFκB estimula la señalización del AR (Chen C. D. y Sawyers 2002; Zhang L. et al.

2009), favoreciendo el crecimiento tumoral independiente de hormonas (Jin et al. 2008). Debido a la importancia de NFκB en las vías de señalización de STAT3 y de AR previamente estudiadas, y considerando el marco inflamatorio del PCa en su etiología y progresión, en este trabajo investigamos la expresión y localización subcelular de RELA (p65) en el PCa. Nuestros resultados demuestran que la inducción de HO-1 también media la disminución de la expresión de RELA en células sensibles a andrógenos y la retención citoplasmática de NFκB en células insensibles a hormona bajo estímulo con IL-6 (Fig. 49 y 50). Por lo tanto, podemos proponer la hipótesis de que la inducción de HO-1 modula negativamente la activación y las vías de señalización de ambos factores, STAT3 y NFκB, contribuyendo al control de la proliferación celular, la invasión, la migración y el crecimiento tumoral en el PCa e impidiendo la angiogénesis (Fig 51).

En conclusión, HO-1 fundamentalmente en nuestro modelo experimental ejercería su función anti-tumoral por interrupción de caminos de señalización claves en el PCa. Considerando que HO-1 pertenece a una familia de chaperonas y se la ha clasificado como HSP32 (Morse y Choi 2005), no podemos descartar que su capacidad de atenuar estas vías de señalización se deba a alteraciones conformacionales provocadas por su asociación a los complejos proteicos determinantes de la actividad de las diferentes vías de señalización. Por otro lado no podemos omitir que su translocación nuclear y asociación a promotores génicos también sea responsable de su rol anti-tumoral. Actualmente se están llevando a cabo en nuestro laboratorio estudios de proteómica para identificar al interactoma de HO-1.

En resumen, se necesitan más estudios para comprender la complejidad de la interrupción de la interacción cruzada cooperativa de estas vías de señalización y si estas evidencias sustentan la posibilidad de que HO-1 emerja como un blanco terapéutico en el PCa.



**Figura 51.** Respresión mediada por HO-1 en los caminos de activación del AR.

El esquema resume la interrupción que ejerce HO-1 sobre la actividad transcripcional del AR. Se muestran la vía de activación del AR dependiente de andrógenos y las redes de señalización alternativas que actúan durante la independencia hormonal. Estos caminos responden a estímulos inflamatorios como las citoquinas y sus receptores conduciendo al encendido de las vías de STAT3 y NFκB, las cuales a su vez modulan la señalización del AR en el PCa. Figura adaptada de Gao ([http://www.ucdmc.ucdavis.edu/urology/research/example/example\\_gao.html](http://www.ucdmc.ucdavis.edu/urology/research/example/example_gao.html)).

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Aaronson D.S. y Horvath C.M. (2002). "A road map for those who don't know JAK-STAT." *Science* 296(5573): 1653-1655.
- Aaronson D.S., Muller M., Neves S.R., Chung W.C., Jayaram G., Iyengar R. y Ram P.T. (2007). "An androgen-IL-6-Stat3 autocrine loop re-routes EGF signal in prostate cancer cells." *Mol Cell Endocrinol* 270(1-2): 50-56.
- Abate-Shen C., Shen M.M. y Gelmann E. (2008). "Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis." *Differentiation* 76(6): 717-727.
- Abdulghani J., Gu L., Dagvadorj A., Lutz J., Leiby B., Bonuccelli G., Lisanti M.P., Zellweger T., Alanen K., Mirtti T., Visakorpi T., Bubendorf L. y Nevalainen M.T. (2008). "Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer." *Am J Pathol* 172(6): 1717-1728.
- Abraham N.G. y Kappas A. (2008). "Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase." *Pharmacol Rev* 60(1): 79-127.
- Aggarwal B.B., Shishodia S., Sandur S.K., Pandey M.K. y Sethi G. (2006). "Inflammation and cancer: how hot is the link?" *Biochem Pharmacol* 72(11): 1605-1621.
- Aggarwal R.R., Ryan C.J. y Chan J.M. (2011). "Insulin-like growth factor pathway: A link between androgen deprivation therapy (ADT), insulin resistance, and disease progression in patients with prostate cancer?" *Urol Oncol*.
- Agoulnik I.U. y Weigel N.L. (2009). "Coactivator selective regulation of androgen receptor activity." *Steroids* 74(8): 669-674.
- Aivaliotis I.L., Pateras I.S., Papaioannou M., Glytsou C., Kontzoglou K., Johnson E.O. y Zoumpourlis V. (2012). "How do cytokines trigger genomic instability?" *J Biomed Biotechnol* 2012: 536761.
- Alam J. y Cook J.L. (2007). "How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?" *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(2): 166-174.
- Alaoui-Jamali M.A., Bismar T.A., Gupta A., Szarek W.A., Su J., Song W., Xu Y., Xu B., Liu G., Vlahakis J.Z., Roman G., Jiao J. y Schipper H.M. (2009). "A novel experimental heme oxygenase-1-targeted therapy for hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Res* 69(20): 8017-8024.
- Alva A. y Hussain M. (2013). "The changing natural history of metastatic prostate cancer." *Cancer J* 19(1): 19-24.
- Amaral T.M., Macedo D., Fernandes I. y Costa L. (2012). "Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment." *Prostate Cancer* 2012: 327253.
- Andreoiu M. y Cheng L. (2010). "Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications." *Hum Pathol* 41(6): 781-793.
- Antonarakis E.S., Keizman D., Zhang Z., Gurel B., Lotan T.L., Hicks J.L., Fedor H.L., Carducci M.A., De Marzo A.M. y Eisenberger M.A. (2012). "An immunohistochemical signature comprising PTEN, MYC, and Ki67 predicts progression in prostate cancer patients receiving adjuvant docetaxel after prostatectomy." *Cancer* 118(24): 6063-6071.
- Araki S., Omori Y., Lyn D., Singh R.K., Meinbach D.M., Sandman Y., Lokeshwar V.B. y Lokeshwar B.L. (2007). "Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer." *Cancer Res* 67(14): 6854-6862.
- Arruda M.A., Rossi A.G., de Freitas M.S., Barja-Fidalgo C. y Graca-Souza A.V. (2004). "Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB." *J Immunol* 173(3): 2023-2030.
- Attar R.M., Takimoto C.H. y Gottardis M.M. (2009). "Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes." *Clin Cancer Res* 15(10): 3251-3255.
- Aydin A., Arsova-Sarafinovska Z., Sayal A., Eken A., Erdem O., Erten K., Ozgok Y. y Dimovski A. (2006). "Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia." *Clin Biochem* 39(2): 176-179.
- Azevedo A., Cunha V., Teixeira A.L. y Medeiros R. (2011). "IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development." *World J Clin Oncol* 2(12): 384-396.

- Bagui T.K., Jackson R.J., Agrawal D. y Pledger W.J. (2000). "Analysis of cyclin D3-cdk4 complexes in fibroblasts expressing and lacking p27(kip1) and p21(cip1)." *Mol Cell Biol* 20(23): 8748-8757.
- Balk S.P., Ko Y.J. y Bublely G.J. (2003). "Biology of prostate-specific antigen." *J Clin Oncol* 21(2): 383-391.
- Barbieri C.E., Demichelis F. y Rubin M.A. (2012). "Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity." *Histopathology* 60(1): 187-198.
- Barron D.A. y Rowley D.R. (2012). "The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression." *Endocr Relat Cancer* 19(6): R187-204.
- Barton B.E., Murphy T.F., Adem P., Watson R.A., Irwin R.J. y Huang H.F. (2001). "IL-6 signaling by STAT3 participates in the change from hyperplasia to neoplasia in NRP-152 and NRP-154 rat prostatic epithelial cells." *BMC Cancer* 1: 19.
- Barton B.E., Murphy T.F., Shu P., Huang H.F., Meyenhofer M. y Barton A. (2004). "Novel single-stranded oligonucleotides that inhibit signal transducer and activator of transcription 3 induce apoptosis in vitro and in vivo in prostate cancer cell lines." *Mol Cancer Ther* 3(10): 1183-1191.
- Bates S.H., Dundon T.A., Seifert M., Carlson M., Maratos-Flier E. y Myers M.G., Jr. (2004). "LRb-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin." *Diabetes* 53(12): 3067-3073.
- Baud V. y Karin M. (2009). "Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls." *Nat Rev Drug Discov* 8(1): 33-40.
- Becker J.C., Fukui H., Imai Y., Sekikawa A., Kimura T., Yamagishi H., Yoshitake N., Pohle T., Domschke W. y Fujimori T. (2007). "Colonic expression of heme oxygenase-1 is associated with a better long-term survival in patients with colorectal cancer." *Scand J Gastroenterol* 42(7): 852-858.
- Bellezza I., Tucci A., Galli F., Grottelli S., Mierla A.L., Pilolli F. y Minelli A. (2012). "Inhibition of NF-kappaB nuclear translocation via HO-1 activation underlies alpha-tocopheryl succinate toxicity." *J Nutr Biochem* 23(12): 1583-1591.
- Berberat P.O., Dambrauskas Z., Gulbinas A., Giese T., Giese N., Kunzli B., Autschbach F., Meuer S., Buchler M.W. y Friess H. (2005). "Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment." *Clin Cancer Res* 11(10): 3790-3798.
- Bethel C.R., Faith D., Li X., Guan B., Hicks J.L., Lan F., Jenkins R.B., Bieberich C.J. y De Marzo A.M. (2006). "Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion." *Cancer Res* 66(22): 10683-10690.
- Biburger M., Theiner G., Schadle M., Schuler G. y Tiegs G. (2010). "Pivotal Advance: Heme oxygenase 1 expression by human CD4+ T cells is not sufficient for their development of immunoregulatory capacity." *J Leukoc Biol* 87(2): 193-202.
- Bindu S., Pal C., Dey S., Goyal M., Alam A., Iqbal M.S., Dutta S., Sarkar S., Kumar R., Maity P. y Bandyopadhyay U. (2011). "Translocation of heme oxygenase-1 to mitochondria is a novel cytoprotective mechanism against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury." *J Biol Chem* 286(45): 39387-39402.
- Blando J.M., Carbajal S., Abel E., Beltran L., Conti C., Fischer S. y DiGiovanni J. (2011). "Cooperation between Stat3 and Akt signaling leads to prostate tumor development in transgenic mice." *Neoplasia* 13(3): 254-265.
- Bollrath J. y Greten F.R. (2009). "IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis." *EMBO Rep* 10(12): 1314-1319.
- Bonecchi R., Locati M. y Mantovani A. (2011). "Chemokines and cancer: a fatal attraction." *Cancer Cell* 19(4): 434-435.
- Bonkhoff H., Stein U. y Remberger K. (1994). "The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate." *Prostate* 24(3): 114-118.
- Bostwick D.G. y Cheng L. (2012). "Precursors of prostate cancer." *Histopathology* 60(1): 4-27.

- Boyd L.K., Mao X., Xue L., Lin D., Chaplin T., Kudahetti S.C., Stankiewicz E., Yu Y., Beltran L., Shaw G., Hines J., Oliver R.T., Berney D.M., Young B.D. y Lu Y.J. (2012). "High-resolution genome-wide copy-number analysis suggests a monoclonal origin of multifocal prostate cancer." *Genes Chromosomes Cancer* 51(6): 579-589.
- Bromberg J.F., Horvath C.M., Besser D., Lathem W.W. y Darnell J.E., Jr. (1998). "Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src." *Mol Cell Biol* 18(5): 2553-2558.
- Bromberg J.F., Wrzeszczynska M.H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R.G., Albanese C. y Darnell J.E., Jr. (1999). "Stat3 as an oncogene." *Cell* 98(3): 295-303.
- Brooke G.N., Parker M.G. y Bevan C.L. (2008). "Mechanisms of androgen receptor activation in advanced prostate cancer: differential co-activator recruitment and gene expression." *Oncogene* 27(21): 2941-2950.
- Brouard S., Otterbein L.E., Anrather J., Tobiasch E., Bach F.H., Choi A.M. y Soares M.P. (2000). "Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis." *J Exp Med* 192(7): 1015-1026.
- Bui M. y Reiter R.E. (1998). "Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer." *Cancer Metastasis Rev* 17(4): 391-399.
- Burd C.E., Sorrentino J.A., Clark K.S., Darr D.B., Krishnamurthy J., Deal A.M., Bardeesy N., Castrillon D.H., Beach D.H. y Sharpless N.E. (2013). "Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model." *Cell* 152(1-2): 340-351.
- Bussolati B. y Mason J.C. (2006). "Dual role of VEGF-induced heme-oxygenase-1 in angiogenesis." *Antioxid Redox Signal* 8(7-8): 1153-1163.
- Canela N., Rodriguez-Vilarrupla A., Estanyol J.M., Diaz C., Pujol M.J., Agell N. y Bachs O. (2003). "The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity." *J Biol Chem* 278(2): 1158-1164.
- Cann K.L. y Hicks G.G. (2007). "Regulation of the cellular DNA double-strand break response." *Biochem Cell Biol* 85(6): 663-674.
- Cano P., Godoy A., Escamilla R., Dhir R. y Onate S.A. (2007). "Stromal-epithelial cell interactions and androgen receptor-coregulator recruitment is altered in the tissue microenvironment of prostate cancer." *Cancer Res* 67(2): 511-519.
- Cardillo M.R., Di Silverio F. y Gentile V. (2006). "Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer." *Anticancer Res* 26(2A): 973-982.
- Castilho A., Azeiteira C.A., Leal E.C., Simoes N.F., Fernandes C.R., Meirinhos R.I., Baptista F.I. y Ambrosio A.F. (2012). "Heme oxygenase-1 protects retinal endothelial cells against high glucose- and oxidative/nitrosative stress-induced toxicity." *PLoS One* 7(8): e42428.
- Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C. y Mantovani A. (2009). "Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability." *Carcinogenesis* 30(7): 1073-1081.
- Collins A.T. y Maitland N.J. (2006). "Prostate cancer stem cells." *Eur J Cancer* 42(9): 1213-1218.
- Converso D.P., Taille C., Carreras M.C., Jaitovich A., Poderoso J.J. y Boczkowski J. (2006). "HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism." *FASEB J* 20(8): 1236-1238.
- Coppe J.P., Rodier F., Patil C.K., Freund A., Desprez P.Y. y Campisi J. (2011). "Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype." *J Biol Chem* 286(42): 36396-36403.
- Crawford E.D. (2003). "Epidemiology of prostate cancer." *Urology* 62(6 Suppl 1): 3-12.
- Culig Z. (2011). "Cytokine imbalance in common human cancers." *Biochim Biophys Acta* 1813(2): 308-314.
- Culig Z., Bartsch G. y Hobisch A. (2002). "Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth." *Mol Cell Endocrinol* 197(1-2): 231-238.
- Culig Z. y Santer F.R. (2012). "Androgen receptor co-activators in the regulation of cellular events in prostate cancer." *World J Urol* 30(3): 297-302.

- Culig Z., Steiner H., Bartsch G. y Hobisch A. (2005). "Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth." *J Cell Biochem* 95(3): 497-505.
- Chandra-Kuntal K. y Singh S.V. (2010). "Diallyl trisulfide inhibits activation of signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer cells in culture and in vivo." *Cancer Prev Res (Phila)* 3(11): 1473-1483.
- Chang M., Kanwar N., Feng E., Siu A., Liu X., Ma D. y Jongstra J. (2010). "PIM kinase inhibitors downregulate STAT3(Tyr705) phosphorylation." *Mol Cancer Ther* 9(9): 2478-2487.
- Chen C.D. y Sawyers C.L. (2002). "NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer." *Mol Cell Biol* 22(8): 2862-2870.
- Chen C.D., Welsbie D.S., Tran C., Baek S.H., Chen R., Vessella R., Rosenfeld M.G. y Sawyers C.L. (2004). "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy." *Nat Med* 10(1): 33-39.
- Chen H.W., Chao C.Y., Lin L.L., Lu C.Y., Liu K.L., Lii C.K. y Li C.C. (2013). "Inhibition of matrix metalloproteinase-9 expression by docosahexaenoic acid mediated by heme oxygenase 1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced MCF-7 human breast cancer cells." *Arch Toxicol*.
- Chen T., Wang L.H. y Farrar W.L. (2000). "Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells." *Cancer Res* 60(8): 2132-2135.
- Chin S.P., Dickinson J.L. y Holloway A.F. (2011). "Epigenetic regulation of prostate cancer." *Clin Epigenetics* 2(2): 151-169.
- Choi B.M., Pae H.O., Jeong Y.R., Kim Y.M. y Chung H.T. (2005). "Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression." *Biochem Biophys Res Commun* 327(4): 1066-1071.
- Choucair K., Ejdelman J., Brimo F., Aprikian A., Chevalier S. y Lapointe J. (2012). "PTEN genomic deletion predicts prostate cancer recurrence and is associated with low AR expression and transcriptional activity." *BMC Cancer* 12: 543.
- Chun J.Y., Nadiminty N., Dutt S., Lou W., Yang J.C., Kung H.J., Evans C.P. y Gao A.C. (2009). "Interleukin-6 regulates androgen synthesis in prostate cancer cells." *Clin Cancer Res* 15(15): 4815-4822.
- Chung L.W., Huang W.C., Sung S.Y., Wu D., Odero-Marah V., Nomura T., Shigemura K., Miyagi T., Seo S., Shi C., Moliterno J., Elmore J., Anderson C., Isotani S., Edlund M., Hsieh C.L., Wang R., Shehata B. y Zhau H.E. (2006). "Stromal-epithelial interaction in prostate cancer progression." *Clin Genitourin Cancer* 5(2): 162-170.
- Danial N.N. y Rothman P. (2000). "JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes." *Oncogene* 19(21): 2523-2531.
- Darshan M.S., Loftus M.S., Thadani-Mulero M., Levy B.P., Escuin D., Zhou X.K., Gjyzezi A., Chanel-Vos C., Shen R., Tagawa S.T., Bander N.H., Nanus D.M. y Giannakakou P. (2011). "Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer." *Cancer Res* 71(18): 6019-6029.
- Dasilva J.O., Amorino G.P., Casarez E.V., Pemberton B. y Parsons S.J. (2012). "Neuroendocrine-derived peptides promote prostate cancer cell survival through activation of IGF-1R signaling." *Prostate*.
- Dayyani F., Gallick G.E., Logothetis C.J. y Corn P.G. (2011). "Novel therapies for metastatic castrate-resistant prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* 103(22): 1665-1675.
- De Falco M. y De Luca A. (2010). "Cell cycle as a target of antineoplastic drugs." *Curr Pharm Des* 16(12): 1417-1426.
- de Martel C., Ferlay J., Franceschi S., Vignat J., Bray F., Forman D. y Plummer M. (2012). "Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis." *Lancet Oncol* 13(6): 607-615.
- De Marzo A.M., Marchi V.L., Epstein J.I. y Nelson W.G. (1999). "Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis." *Am J Pathol* 155(6): 1985-1992.
- De Marzo A.M., Nelson W.G., Meeker A.K. y Coffey D.S. (1998). "Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells." *J Urol* 160(6 Pt 2): 2381-2392.



- De Marzo A.M., Platz E.A., Sutcliffe S., Xu J., Gronberg H., Drake C.G., Nakai Y., Isaacs W.B. y Nelson W.G. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* 7(4): 256-269.
- De Miguel F., Lee S.O., Onate S.A. y Gao A.C. (2003). "Stat3 enhances transactivation of steroid hormone receptors." *Nucl Recept* 1(1): 3.
- De Nunzio C., Kramer G., Marberger M., Montironi R., Nelson W., Schroder F., Sciarra A. y Tubaro A. (2011). "The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation." *Eur Urol* 60(1): 106-117.
- Degese M.S., Mendizabal J.E., Gandini N.A., Gutkind J.S., Molinolo A., Hewitt S.M., Curino A.C., Coso O.A. y Facchinetti M.M. (2012). "Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data." *Lung Cancer* 77(1): 168-175.
- Dehm S.M. y Tindall D.J. (2011). "Alternatively spliced androgen receptor variants." *Endocr Relat Cancer* 18(5): R183-196.
- Deininger M.H., Meyermann R., Trautmann K., Duffner F., Grote E.H., Wickboldt J. y Schluessener H.J. (2000). "Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression." *Brain Res* 882(1-2): 1-8.
- Demaison C., Parsley K., Brouns G., Scherr M., Battmer K., Kinnon C., Grez M. y Thrasher A.J. (2002). "High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter." *Hum Gene Ther* 13(7): 803-813.
- Deramautd B.M., Remy P. y Abraham N.G. (1999). "Upregulation of human heme oxygenase gene expression by Ets-family proteins." *J Cell Biochem* 72(3): 311-321.
- Deshane J., Chen S., Caballero S., Grochot-Przeczek A., Was H., Li Calzi S., Lach R., Hock T.D., Chen B., Hill-Kapturczak N., Siegal G.P., Dulak J., Jozkowicz A., Grant M.B. y Agarwal A. (2007). "Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism." *J Exp Med* 204(3): 605-618.
- Devlin H.L. y Mudryj M. (2009). "Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence." *Cancer Lett* 274(2): 177-186.
- Devore, Ed. (2007). Probability and statistics for engineers and the sciences. Belmont.
- Dickson M.A. y Schwartz G.K. (2009). "Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy." *Curr Oncol* 16(2): 36-43.
- Dijkstra S., Hamid A.R., Leyten G.H. y Schalken J.A. (2012). "Personalized management in low-risk prostate cancer: the role of biomarkers." *Prostate Cancer* 2012: 327104.
- Dillard P.R., Lin M.F. y Khan S.A. (2008). "Androgen-independent prostate cancer cells acquire the complete steroidogenic potential of synthesizing testosterone from cholesterol." *Mol Cell Endocrinol* 295(1-2): 115-120.
- Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Cole R.N., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Yamamoto M. y Talalay P. (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11908-11913.
- Doi K., Akaike T., Fujii S., Tanaka S., Ikebe N., Beppu T., Shibahara S., Ogawa M. y Maeda H. (1999). "Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth." *Br J Cancer* 80(12): 1945-1954.
- Dolled-Filhart M., Camp R.L., Kowalski D.P., Smith B.L. y Rimm D.L. (2003). "Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis." *Clin Cancer Res* 9(2): 594-600.
- Drachenberg D.E., Elgamal A.A., Rowbotham R., Peterson M. y Murphy G.P. (1999). "Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer." *Prostate* 41(2): 127-133.

- Dulak J., Jozkowicz A., Foresti R., Kasza A., Frick M., Huk I., Green C.J., Pachinger O., Weidinger F. y Motterlini R. (2002). "Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells." *Antioxid Redox Signal* 4(2): 229-240.
- Durante W. (2003). "Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease." *J Cell Physiol* 195(3): 373-382.
- Ewing J.F. y Maines M.D. (2006). "Regulation and expression of heme oxygenase enzymes in aged-rat brain: age related depression in HO-1 and HO-2 expression and altered stress-response." *J Neural Transm* 113(4): 439-454.
- Felici A., Pino M.S. y Carlini P. (2012). "A changing landscape in castration-resistant prostate cancer treatment." *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 85.
- Ferrando M. (2013). HO-1 en la progresión ósea del cáncer de próstata. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Ferrando M., Gueron G., Elguero B., Giudice J., Salles A., Leskow F.C., Jares-Erijman E.A., Colombo L., Meiss R., Navone N., De Siervi A. y Vazquez E. (2011). "Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer." *Angiogenesis*.
- Ferrara N., Gerber H.P. y LeCouter J. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* 9(6): 669-676.
- Furchgott R.F. y Jothianandan D. (1991). "Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light." *Blood Vessels* 28(1-3): 52-61.
- Gandini N.A., Fermento M.E., Salomon D.G., Blasco J., Patel V., Gutkind J.S., Molinolo A.A., Facchinetti M.M. y Curino A.C. (2012). "Nuclear localization of heme oxygenase-1 is associated with tumor progression of head and neck squamous cell carcinomas." *Exp Mol Pathol* 93(2): 237-245.
- Garber K. (2010). "A tale of two cells: discovering the origin of prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* 102(20): 1528-1529, 1535.
- Germain D. y Frank D.A. (2007). "Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy." *Clin Cancer Res* 13(19): 5665-5669.
- Giordano A., Nisoli E., Tonello C., Canello R., Carruba M.O. y Cinti S. (2000). "Expression and distribution of heme oxygenase-1 and -2 in rat brown adipose tissue: the modulatory role of the noradrenergic system." *FEBS Lett* 487(2): 171-175.
- Giri D., Ozen M. y Ittmann M. (2001). "Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer." *Am J Pathol* 159(6): 2159-2165.
- Gleason D.F. (1966). "Classification of prostatic carcinomas." *Cancer Chemother Rep* 50(3): 125-128.
- Golias C., Iliadis I., Peschos D. y Charalabopoulos K. (2009). "Amplification and co-regulators of androgen receptor gene in prostate cancer." *Exp Oncol* 31(1): 3-8.
- Gonzalez-Michaca L., Farrugia G., Croatt A.J., Alam J. y Nath K.A. (2004). "Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells." *Am J Physiol Renal Physiol* 286(2): F370-377.
- Goodman A.I., Choudhury M., da Silva J.L., Schwartzman M.L. y Abraham N.G. (1997). "Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma." *Proc Soc Exp Biol Med* 214(1): 54-61.
- Gozzelino R., Jeney V. y Soares M.P. (2010). "Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 323-354.
- Grivennikov S.I., Greten F.R. y Karin M. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." *Cell* 140(6): 883-899.
- Grivennikov S.I. y Karin M. (2010). "Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* 21(1): 11-19.
- Grochot-Przeczek A., Dulak J. y Jozkowicz A. (2012). "Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology." *Clin Sci (Lond)* 122(3): 93-103.

- Gueron G., De Siervi A., Ferrando M., Salierno M., De Luca P., Elguero B., Meiss R., Navone N. y Vazquez E.S. (2009). "Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells." *Mol Cancer Res* 7(11): 1745-1755.
- Gueron G., De Siervi A. y Vazquez E. (2011). "Key questions in metastasis: new insights in molecular pathways and therapeutic implications." *Curr Pharm Biotechnol* 12(11): 1867-1880.
- Gueron G., De Siervi A. y Vazquez E. (2012). "Advanced prostate cancer: reinforcing the strings between inflammation and the metastatic behavior." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 15(3): 213-221.
- Guo Y., Xu F., Lu T., Duan Z. y Zhang Z. (2012). "Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer." *Cancer Treat Rev* 38(7): 904-910.
- Guo Z., Yang X., Sun F., Jiang R., Linn D.E., Chen H., Kong X., Melamed J., Tepper C.G., Kung H.J., Brodie A.M., Edwards J. y Qiu Y. (2009). "A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth." *Cancer Res* 69(6): 2305-2313.
- Gupta A., Cao W., Sadashivaiah K., Chen W., Schneider A. y Chellaiah M.A. (2013). "Promising noninvasive cellular phenotype in prostate cancer cells knockdown of matrix metalloproteinase 9." *ScientificWorldJournal* 2013: 493689.
- Hahm E.R. y Singh S.V. (2010). "Sulforaphane inhibits constitutive and interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer cells." *Cancer Prev Res (Phila)* 3(4): 484-494.
- Hamid A.R., Umbas R. y Mochtar C.A. (2011). "Recent role of inflammation in prostate diseases: chemoprevention development opportunity." *Acta Med Indones* 43(1): 59-65.
- Han G., Yu J.Y., Chen Y.D., Cao X.L., Zhu J., Wang W., Wang X.X., Zhang X., Yan J.Q. y Gao J.P. (2012). "The usefulness of phosphorylated-signal transduction and activators of transcription 3 in detecting prostate cancer from negative biopsies." *Eur J Surg Oncol* 38(4): 367-373.
- Han H.Y., Wang X.H., Wang N.L., Ling M.T., Wong Y.C. y Yao X.S. (2008). "Lignans isolated from *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl. decreased prostate specific antigen and androgen receptor expression in LNCaP cells." *J Agric Food Chem* 56(16): 6928-6935.
- Hanahan D. y Weinberg R.A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Harik L.R. y O'Toole K.M. (2012). "Nonneoplastic lesions of the prostate and bladder." *Arch Pathol Lab Med* 136(7): 721-734.
- Hayashi S., Omata Y., Sakamoto H., Higashimoto Y., Hara T., Sagara Y. y Noguchi M. (2004). "Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene." *Gene* 336(2): 241-250.
- He B., You L., Uematsu K., Zang K., Xu Z., Lee A.Y., Costello J.F., McCormick F. y Jablons D.M. (2003). "SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14133-14138.
- He M. y Young C.Y. (2009). "New approaches to target the androgen receptor and STAT3 for prostate cancer treatments." *Mini Rev Med Chem* 9(3): 395-400.
- Heemers H.V. y Tindall D.J. (2007). "Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex." *Endocr Rev* 28(7): 778-808.
- Heinrich P.C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F. y Graeve L. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." *Biochem J* 334 ( Pt 2): 297-314.
- Hermeking H. y Benzinger A. (2006). "14-3-3 proteins in cell cycle regulation." *Semin Cancer Biol* 16(3): 183-192.
- Hobisch A., Rogatsch H., Hittmair A., Fuchs D., Bartsch G., Jr., Klocker H., Bartsch G. y Culig Z. (2000). "Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue." *J Pathol* 191(3): 239-244.

- Horinaga M., Okita H., Nakashima J., Kanao K., Sakamoto M. y Murai M. (2005). "Clinical and pathologic significance of activation of signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer." *Urology* 66(3): 671-675.
- Horoszewicz J.S., Leong S.S., Kawinski E., Karr J.P., Rosenthal H., Chu T.M., Mirand E.A. y Murphy G.P. (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma." *Cancer Res* 43(4): 1809-1818.
- Hsiao J.R., Jin Y.T., Tsai S.T., Shiau A.L., Wu C.L. y Su W.C. (2003). "Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis." *Br J Cancer* 89(2): 344-349.
- Hu J.L., Xiao L., Li Z.Y., Wang Q., Chang Y. y Jin Y. (2013). "Upregulation of HO-1 is accompanied by activation of p38MAPK and mTOR in human oesophageal squamous carcinoma cells." *Cell Biol Int*.
- Huang C. y Xie K. (2012). "Crosstalk of Sp1 and Stat3 signaling in pancreatic cancer pathogenesis." *Cytokine Growth Factor Rev* 23(1-2): 25-35.
- Huang S. (2007). "Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications." *Clin Cancer Res* 13(5): 1362-1366.
- Huber Iii W.J., Scruggs B.A. y Backes W.L. (2009). "C-Terminal membrane spanning region of human heme oxygenase-1 mediates a time-dependent complex formation with cytochrome P450 reductase." *Biochemistry* 48(1): 190-197.
- Hung W. y Elliott B. (2001). "Co-operative effect of c-Src tyrosine kinase and Stat3 in activation of hepatocyte growth factor expression in mammary carcinoma cells." *J Biol Chem* 276(15): 12395-12403.
- Ishteiwy R.A., Ward T.M., Dykxhoorn D.M. y Burnstein K.L. (2012). "The microRNA -23b/-27b cluster suppresses the metastatic phenotype of castration-resistant prostate cancer cells." *PLoS One* 7(12): e52106.
- Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M. y Nabeshima Y. (1997). "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." *Biochem Biophys Res Commun* 236(2): 313-322.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E. y Forman D. (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* 61(2): 69-90.
- Jeon E.M., Choi H.C., Lee K.Y., Chang K.C. y Kang Y.J. (2009). "Hemin inhibits hypertensive rat vascular smooth muscle cell proliferation through regulation of cyclin D and p21." *Arch Pharm Res* 32(3): 375-382.
- Jia L., Choong C.S., Ricciardelli C., Kim J., Tilley W.D. y Coetzee G.A. (2004). "Androgen receptor signaling: mechanism of interleukin-6 inhibition." *Cancer Res* 64(7): 2619-2626.
- Jin R.J., Lho Y., Connelly L., Wang Y., Yu X., Saint Jean L., Case T.C., Ellwood-Yen K., Sawyers C.L., Bhowmick N.A., Blackwell T.S., Yull F.E. y Matusik R.J. (2008). "The nuclear factor-kappaB pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth." *Cancer Res* 68(16): 6762-6769.
- Johnston P.A. y Grandis J.R. (2011). "STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges." *Mol Interv* 11(1): 18-26.
- Jozkowicz A., Was H. y Dulak J. (2007). "Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend?" *Antioxid Redox Signal* 9(12): 2099-2117.
- Kaighn M.E., Narayan K.S., Ohnuki Y., Lechner J.F. y Jones L.W. (1979). "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)." *Invest Urol* 17(1): 16-23.
- Kandala P.K. y Srivastava S.K. (2012). "Diindolylmethane suppresses ovarian cancer growth and potentiates the effect of cisplatin in tumor mouse model by targeting signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)." *BMC Med* 10: 9.
- Kapturczak M.H., Wasserfall C., Brusko T., Campbell-Thompson M., Ellis T.M., Atkinson M.A. y Agarwal A. (2004). "Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse." *Am J Pathol* 165(3): 1045-1053.

- Katori M., Buelow R., Ke B., Ma J., Coito A.J., Iyer S., Southard D., Busuttil R.W. y Kupiec-Weglinski J.W. (2002). "Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway." *Transplantation* 73(2): 287-292.
- Kazma R., Mefford J.A., Cheng I., Plummer S.J., Levin A.M., Rybicki B.A., Casey G. y Witte J.S. (2012). "Association of the innate immunity and inflammation pathway with advanced prostate cancer risk." *PLoS One* 7(12): e51680.
- Ke B., Shen X.D., Ji H., Kamo N., Gao F., Freitas M.C., Busuttil R.W. y Kupiec-Weglinski J.W. (2012). "HO-1-STAT3 axis in mouse liver ischemia/reperfusion injury: regulation of TLR4 innate responses through PI3K/PTEN signaling." *J Hepatol* 56(2): 359-366.
- Khandrika L., Kumar B., Koul S., Maroni P. y Koul H.K. (2009). "Oxidative stress in prostate cancer." *Cancer Lett* 282(2): 125-136.
- Kim H.P., Pae H.O., Back S.H., Chung S.W., Woo J.M., Son Y. y Chung H.T. (2011). "Heme oxygenase-1 comes back to endoplasmic reticulum." *Biochem Biophys Res Commun* 404(1): 1-5.
- Kim H.P., Wang X., Galbiati F., Ryter S.W. y Choi A.M. (2004). "Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells." *FASEB J* 18(10): 1080-1089.
- Kim J. y Coetzee G.A. (2004). "Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor." *J Cell Biochem* 93(2): 233-241.
- Kim M.J., Bhatia-Gaur R., Banach-Petrosky W.A., Desai N., Wang Y., Hayward S.W., Cunha G.R., Cardiff R.D., Shen M.M. y Abate-Shen C. (2002). "Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis." *Cancer Res* 62(11): 2999-3004.
- Kim Y.S., Kumar V., Lee S., Iwai A., Neckers L., Malhotra S.V. y Trepel J.B. (2012). "Methoxychalcone inhibitors of androgen receptor translocation and function." *Bioorg Med Chem Lett* 22(5): 2105-2109.
- Kitano T., Yoda H., Tabata K., Miura M., Toriyama M., Motohashi S. y Suzuki T. (2012). "Vitamin K3 analogs induce selective tumor cytotoxicity in neuroblastoma." *Biol Pharm Bull* 35(4): 617-623.
- Klezovitch O., Risk M., Coleman I., Lucas J.M., Null M., True L.D., Nelson P.S. y Vasioukhin V. (2008). "A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6): 2105-2110.
- Klink J.C., Miocinovic R., Magi Galluzzi C. y Klein E.A. (2012). "High-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Korean J Urol* 53(5): 297-303.
- Koliaraki V. y Kollias G. (2011). "A new role for myeloid HO-1 in the innate to adaptive crosstalk and immune homeostasis." *Adv Exp Med Biol* 780: 101-111.
- Kong D., Li Y., Wang Z., Banerjee S. y Sarkar F.H. (2007). "Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer." *Cancer Res* 67(7): 3310-3319.
- Konig J.E., Senge T., Allhoff E.P. y Konig W. (2004). "Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer." *Prostate* 58(2): 121-129.
- Koochekpour S. (2010). "Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer." *Asian J Androl* 12(5): 639-657.
- Kortylewski M., Kujawski M., Wang T., Wei S., Zhang S., Pilon-Thomas S., Niu G., Kay H., Mule J., Kerr W.G., Jove R., Pardoll D. y Yu H. (2005). "Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity." *Nat Med* 11(12): 1314-1321.
- Kortylewski M., Xin H., Kujawski M., Lee H., Liu Y., Harris T., Drake C., Pardoll D. y Yu H. (2009). "Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment." *Cancer Cell* 15(2): 114-123.
- Kozakowska M., Ciesla M., Stefanska A., Skrzypek K., Was H., Jazwa A., Grochot-Przeczek A., Kotlinowski J., Szymula A., Bartelik A., Mazan M., Yagensky O., Florczyk U., Lemke K., Zebzda A., Dyduch G., Nowak W., Szade K., Stepniowski J., Majka M., Derlacz R., Loboda

- A., Dulak J. y Jozkowicz A. (2012). "Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs." *Antioxid Redox Signal* 16(2): 113-127.
- Kral M., Rosinska V., Student V., Grepl M., Hrabec M. y Bouchal J. (2011). "Genetic determinants of prostate cancer: a review." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155(1): 3-9.
- Kronke G., Bochkov V.N., Huber J., Gruber F., Bluml S., Furnkranz A., Kadl A., Binder B.R. y Leitinger N. (2003). "Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein." *J Biol Chem* 278(51): 51006-51014.
- Kumar B., Koul S., Khandrika L., Meacham R.B. y Koul H.K. (2008). "Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype." *Cancer Res* 68(6): 1777-1785.
- Kumar D., Bhaskaran M., Alagappan L., Tori D., Yadav I., Konkimalla S., Magoon S. y Singhal P.C. (2010). "Heme oxygenase-1 modulates mesangial cell proliferation by p21 Waf1 upregulation." *Ren Fail* 32(2): 254-258.
- Kundu J.K. y Surh Y.J. (2012). "Emerging avenues linking inflammation and cancer." *Free Radic Biol Med* 52(9): 2013-2037.
- Kwok S.C., Samuel S.P. y Handal J. (2012). "Atorvastatin activates heme oxygenase-1 at the stress response elements." *J Cell Mol Med* 16(2): 394-400.
- Kwon G.T., Jung J.I., Song H.R., Woo E.Y., Jun J.G., Kim J.K., Her S. y Park J.H. (2012). "Piceatannol inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased interleukin-6 signaling." *J Nutr Biochem* 23(3): 228-238.
- Langlais D., Couture C., Balsalobre A. y Drouin J. (2012). "The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome." *Mol Cell* 47(1): 38-49.
- Lawrence M.G., Stephens C.R., Need E.F., Lai J., Buchanan G. y Clements J.A. (2012). "Long terminal repeats act as androgen-responsive enhancers for the PSA-kallikrein locus." *Endocrinology* 153(7): 3199-3210.
- Lee H., Herrmann A., Deng J.H., Kujawski M., Niu G., Li Z., Forman S., Jove R., Pardoll D.M. y Yu H. (2009a). "Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors." *Cancer Cell* 15(4): 283-293.
- Lee S.O., Chun J.Y., Nadiminty N., Lou W., Feng S. y Gao A.C. (2009b). "Interleukin-4 activates androgen receptor through CBP/p300." *Prostate* 69(2): 126-132.
- Lee S.O., Chun J.Y., Nadiminty N., Lou W. y Gao A.C. (2007). "Interleukin-6 undergoes transition from growth inhibitor associated with neuroendocrine differentiation to stimulator accompanied by androgen receptor activation during LNCaP prostate cancer cell progression." *Prostate* 67(7): 764-773.
- Lee S.O., Lou W., Qureshi K.M., Mehraein-Ghomi F., Trump D.L. y Gao A.C. (2004). "RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells." *Prostate* 60(4): 303-309.
- Lee Y.M., Jeong G.S., Lim H.D., An R.B., Kim Y.C. y Kim E.C. (2010). "Isoliquiritigenin 2'-methyl ether induces growth inhibition and apoptosis in oral cancer cells via heme oxygenase-1." *Toxicol In Vitro* 24(3): 776-782.
- Leitzmann M.F. y Rohrmann S. (2012). "Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates." *Clin Epidemiol* 4: 1-11.
- Levy D.E. y Lee C.K. (2002). "What does Stat3 do?" *J Clin Invest* 109(9): 1143-1148.
- Li M., Liu Y., Shi H., Zhang Y., Wang G., Xu J., Lu J., Zhang D., Xie X., Han D., Wu Y. y Li S. (2012). "Statins inhibit pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by upregulation of HO-1 and p21WAF1." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 385(10): 961-968.
- Li Volti G., Sacerdoti D., Sangras B., Vanella A., Mezentssev A., Scapagnini G., Falck J.R. y Abraham N.G. (2005). "Carbon monoxide signaling in promoting angiogenesis in human microvessel endothelial cells." *Antioxid Redox Signal* 7(5-6): 704-710.

- Li W., Tanaka K., Morioka K., Uesaka T., Yamada N., Takamori A., Handa M., Tanabe S. y Ihaya A. (2005). "Thymidine phosphorylase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1 and p27KIP1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(7): 1370-1375.
- Li Y., Su J., DingZhang X., Zhang J., Yoshimoto M., Liu S., Bijian K., Gupta A., Squire J.A., Alaoui Jamali M.A. y Bismar T.A. (2011). "PTEN deletion and heme oxygenase-1 overexpression cooperate in prostate cancer progression and are associated with adverse clinical outcome." *J Pathol* 224(1): 90-100.
- Lin E.Y. y Pollard J.W. (2004). "Macrophages: modulators of breast cancer progression." *Novartis Found Symp* 256: 158-168; discussion 168-172, 259-169.
- Lin Q., Weis S., Yang G., Weng Y.H., Helston R., Rish K., Smith A., Bordner J., Polte T., Gaunitz F. y Dennery P.A. (2007). "Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress." *J Biol Chem* 282(28): 20621-20633.
- Lin Q.S., Weis S., Yang G., Zhuang T., Abate A. y Dennery P.A. (2008). "Catalytic inactive heme oxygenase-1 protein regulates its own expression in oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 44(5): 847-855.
- Lippman S.M., Goodman P.J., Klein E.A., Parnes H.L., Thompson I.M., Jr., Kristal A.R., Santella R.M., Probstfield J.L., Moinpour C.M., Albanes D., Taylor P.R., Minasian L.M., Hoque A., Thomas S.M., Crowley J.J., Gaziano J.M., Stanford J.L., Cook E.D., Fleshner N.E., Lieber M.M., Walther P.J., Khuri F.R., Karp D.D., Schwartz G.G., Ford L.G. y Coltman C.A., Jr. (2005). "Designing the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)." *J Natl Cancer Inst* 97(2): 94-102.
- Liu M., Amodu A.S., Pitts S., Patrickson J., Hibbert J.M., Battle M., Ofori-Acquah S.F. y Stiles J.K. (2012). "Heme mediated STAT3 activation in severe malaria." *PLoS One* 7(3): e34280.
- Liu S., Yuan Y., Okumura Y., Shinkai N. y Yamauchi H. (2010). "Camptothecin disrupts androgen receptor signaling and suppresses prostate cancer cell growth." *Biochem Biophys Res Commun* 394(2): 297-302.
- Liu W., Laitinen S., Khan S., Vihinen M., Kowalski J., Yu G., Chen L., Ewing C.M., Eisenberger M.A., Carducci M.A., Nelson W.G., Yegnasubramanian S., Luo J., Wang Y., Xu J., Isaacs W.B., Visakorpi T. y Bova G.S. (2009). "Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer." *Nat Med* 15(5): 559-565.
- Loboda A., Jazwa A., Grochot-Przeczek A., Rutkowski A.J., Cisowski J., Agarwal A., Jozkowicz A. y Dulak J. (2008). "Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* 10(10): 1767-1812.
- Lonard D.M. y O'Malley B W. (2007). "Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation." *Mol Cell* 27(5): 691-700.
- Long R.M., Morrissey C., Fitzpatrick J.M. y Watson R.W. (2005). "Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies." *Clin Sci (Lond)* 108(1): 1-11.
- Lundvig D.M., Immenschuh S. y Wagener F.A. (2012). "Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: the good, the bad, and the ugly?" *Front Pharmacol* 3: 81.
- Maines M.D. y Abrahamsson P.A. (1996). "Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution." *Urology* 47(5): 727-733.
- Maines M.D. y Gibbs P.E. (2005). "30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events." *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 568-577.
- Malinowska K., Neuwirt H., Cavarretta I.T., Bektic J., Steiner H., Dietrich H., Moser P.L., Fuchs D., Hobisch A. y Culig Z. (2009). "Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor." *Endocr Relat Cancer* 16(1): 155-169.
- Mantovani A. (2009). "Cancer: Inflaming metastasis." *Nature* 457(7225): 36-37.

- Mao X., Boyd L.K., Yanez-Munoz R.J., Chaplin T., Xue L., Lin D., Shan L., Berney D.M., Young B.D. y Lu Y.J. (2011). "Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer." *Am J Cancer Res* 1(5): 604-617.
- Marinissen M.J., Tanos T., Bolos M., de Sagarra M.R., Coso O.A. y Cuadrado A. (2006). "Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor." *J Biol Chem* 281(16): 11332-11346.
- Masamune A., Satoh M., Kikuta K., Suzuki N. y Shimosegawa T. (2005). "Activation of JAK-STAT pathway is required for platelet-derived growth factor-induced proliferation of pancreatic stellate cells." *World J Gastroenterol* 11(22): 3385-3391.
- Matsuda T., Junicho A., Yamamoto T., Kishi H., Korkmaz K., Saatcioglu F., Fuse H. y Muraguchi A. (2001). "Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* 283(1): 179-187.
- Matsumoto T., Sakari M., Okada M., Yokoyama A., Takahashi S., Kouzmenko A. y Kato S. (2013). "The androgen receptor in health and disease." *Annu Rev Physiol* 75: 201-224.
- McCarron S.L., Edwards S., Evans P.R., Gibbs R., Dearnaley D.P., Dowe A., Southgate C., Easton D.F., Eeles R.A. y Howell W.M. (2002). "Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer." *Cancer Res* 62(12): 3369-3372.
- McCoubrey W.K., Jr., Huang T.J. y Maines M.D. (1997). "Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis." *J Biol Chem* 272(19): 12568-12574.
- McFarland B.C., Gray G.K., Nozell S.E., Hong S.W. y Benveniste E.N. (2013). "Activation of the NK-kappaB pathway by the STAT3 inhibitor JSI-124 in human glioblastoma cells." *Mol Cancer Res*.
- Mechergui Y.B., Ben Jemaa A., Mezigh C., Fraile B., Ben Rais N., Paniagua R., Royuela M. y Oueslati R. (2009). "The profile of prostate epithelial cytokines and its impact on sera prostate specific antigen levels." *Inflammation* 32(3): 202-210.
- Megias J., Busserolles J. y Alcaraz M.J. (2007). "The carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 inhibits the inflammatory response induced by cytokines in Caco-2 cells." *Br J Pharmacol* 150(8): 977-986.
- Mehra R., Tomlins S.A., Yu J., Cao X., Wang L., Menon A., Rubin M.A., Pienta K.J., Shah R.B. y Chinnaiyan A.M. (2008). "Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer." *Cancer Res* 68(10): 3584-3590.
- Memarzadeh S., Xin L., Mulholland D.J., Mansukhani A., Wu H., Teitell M.A. y Witte O.N. (2007). "Enhanced paracrine FGF10 expression promotes formation of multifocal prostate adenocarcinoma and an increase in epithelial androgen receptor." *Cancer Cell* 12(6): 572-585.
- Mohr A., Chatain N., Domszalai T., Rinis N., Sommerauer M., Vogt M. y Muller-Newen G. (2012). "Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling." *Eur J Cell Biol* 91(6-7): 524-532.
- Montgomery R.B., Mostaghel E.A., Vessella R., Hess D.L., Kalthorn T.F., Higano C.S., True L.D. y Nelson P.S. (2008). "Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth." *Cancer Res* 68(11): 4447-4454.
- Mora L.B., Buettner R., Seigne J., Diaz J., Ahmad N., Garcia R., Bowman T., Falcone R., Fairclough R., Cantor A., Muro-Cacho C., Livingston S., Karras J., Pow-Sang J. y Jove R. (2002). "Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells." *Cancer Res* 62(22): 6659-6666.
- Morita T., Perrella M.A., Lee M.E. y Kourembanas S. (1995). "Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1475-1479.
- Morse D. y Choi A.M. (2005). "Heme oxygenase-1: from bench to bedside." *Am J Respir Crit Care Med* 172(6): 660-670.
- Morse D., Lin L., Choi A.M. y Ryter S.W. (2009). "Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease." *Free Radic Biol Med* 47(1): 1-12.



- Morse D., Pischke S.E., Zhou Z., Davis R.J., Flavell R.A., Loop T., Otterbein S.L., Otterbein L.E. y Choi A.M. (2003). "Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1." *J Biol Chem* 278(39): 36993-36998.
- Mostaghel E.A. y Nelson P.S. (2008). "Intracrine androgen metabolism in prostate cancer progression: mechanisms of castration resistance and therapeutic implications." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(2): 243-258.
- Mukherjee R., McGuinness D.H., McCall P., Underwood M.A., Seywright M., Orange C. y Edwards J. (2011). "Upregulation of MAPK pathway is associated with survival in castrate-resistant prostate cancer." *Br J Cancer* 104(12): 1920-1928.
- Mulholland D.J., Cox M., Read J., Rennie P. y Nelson C. (2004). "Androgen responsiveness of Renilla luciferase reporter vectors is promoter, transgene, and cell line dependent." *Prostate* 59(2): 115-119.
- Muppala V., Lin C.S. y Lee Y.H. (2000). "The role of HNF-1alpha in controlling hepatic catalase activity." *Mol Pharmacol* 57(1): 93-100.
- Nadiminty N. y Gao A.C. (2012). "Mechanisms of persistent activation of the androgen receptor in CRPC: recent advances and future perspectives." *World J Urol* 30(3): 287-295.
- Nagpal J.K., Mishra R. y Das B.R. (2002). "Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis." *Cancer* 94(9): 2393-2400.
- Nakashima J., Tachibana M., Horiguchi Y., Oya M., Ohigashi T., Asakura H. y Murai M. (2000). "Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer." *Clin Cancer Res* 6(7): 2702-2706.
- Narayanan R., Yepuru M., Szafran A.T., Szwarc M., Bohl C.E., Young N.L., Miller D.D., Mancini M.A. y Dalton J.T. (2010). "Discovery and mechanistic characterization of a novel selective nuclear androgen receptor exporter for the treatment of prostate cancer." *Cancer Res* 70(2): 842-851.
- Nardella C., Clohessy J.G., Alimonti A. y Pandolfi P.P. (2011). "Pro-senescence therapy for cancer treatment." *Nat Rev Cancer* 11(7): 503-511.
- Narita M. y Lowe S.W. (2005). "Senescence comes of age." *Nat Med* 11(9): 920-922.
- Ni Z., Lou W., Leman E.S. y Gao A.C. (2000). "Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells." *Cancer Res* 60(5): 1225-1228.
- O'Malley B.W. y Kumar R. (2009). "Nuclear receptor coregulators in cancer biology." *Cancer Res* 69(21): 8217-8222.
- Ockaili R., Natarajan R., Salloum F., Fisher B.J., Jones D., Fowler A.A., 3rd y Kukreja R.C. (2005). "HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(2): H542-548.
- Okamoto M., Hattori K. y Oyasu R. (1997). "Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro." *Int J Cancer* 72(1): 149-154.
- Otterbein L.E., Bach F.H., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis R.J., Flavell R.A. y Choi A.M. (2000). "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway." *Nat Med* 6(4): 422-428.
- Otterbein L.E., Soares M.P., Yamashita K. y Bach F.H. (2003). "Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme." *Trends Immunol* 24(8): 449-455.
- Ouyang X., DeWeese T.L., Nelson W.G. y Abate-Shen C. (2005). "Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis." *Cancer Res* 65(15): 6773-6779.
- Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Chae S.C., Kim Y.M., Chung K.R. y Chung H.T. (2004). "Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production." *J Immunol* 172(8): 4744-4751.
- Paine A., Eiz-Vesper B., Blasczyk R. y Immenschuh S. (2010). "Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential." *Biochem Pharmacol* 80(12): 1895-1903.

- Pakneshan P., Xing R.H. y Rabbani S.A. (2003). "Methylation status of uPA promoter as a molecular mechanism regulating prostate cancer invasion and growth in vitro and in vivo." *FASEB J* 17(9): 1081-1088.
- Park O.K., Schaefer T.S. y Nathans D. (1996). "In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13704-13708.
- Parray A., Siddique H.R., Nanda S., Konety B.R. y Saleem M. (2012). "Castration-resistant prostate cancer: potential targets and therapies." *Biologics* 6: 267-276.
- Parsons J.T. y Parsons S.J. (1997). "Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways." *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 187-192.
- Patel H.H. y Insel P.A. (2009). "Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling." *Antioxid Redox Signal* 11(6): 1357-1372.
- Pathak S.K., Sharma R.A., Steward W.P., Mellon J.K., Griffiths T.R. y Gescher A.J. (2005). "Oxidative stress and cyclooxygenase activity in prostate carcinogenesis: targets for chemopreventive strategies." *Eur J Cancer* 41(1): 61-70.
- Peltola M.T., Niemela P., Alanen K., Nurmi M., Lilja H. y Pettersson K. (2011). "Immunoassay for the discrimination of free prostate-specific antigen (fPSA) forms with internal cleavages at Lys((1)(4)(5)) or Lys((1)(4)(6)) from fPSA without internal cleavages at Lys((1)(4)(5)) or Lys((1)(4)(6))." *J Immunol Methods* 369(1-2): 74-80.
- Poss K.D. y Tonegawa S. (1997). "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10925-10930.
- Prawan A., Kundu J.K. y Surh Y.J. (2005). "Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection." *Antioxid Redox Signal* 7(11-12): 1688-1703.
- Proietti C.J., Beguelin W., Flaque M.C., Cayrol F., Rivas M.A., Tkach M., Charreau E.H., Schillaci R. y Elizalde P.V. (2011). "Novel role of signal transducer and activator of transcription 3 as a progesterone receptor coactivator in breast cancer." *Steroids* 76(4): 381-392.
- Puhr M., Hoefler J., Schafer G., Erb H.H., Oh S.J., Klocker H., Heidegger I., Neuwirt H. y Culig Z. (2012). "Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205." *Am J Pathol* 181(6): 2188-2201.
- Putzi M.J. y De Marzo A.M. (2000). "Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Urology* 56(5): 828-832.
- Quax P.H., de Bart A.C., Schalken J.A. y Verheijen J.H. (1997). "Plasminogen activator and matrix metalloproteinase production and extracellular matrix degradation by rat prostate cancer cells in vitro: correlation with metastatic behavior in vivo." *Prostate* 32(3): 196-204.
- Rabbani S.A., Ateeq B., Arakelian A., Valentino M.L., Shaw D.E., Dauffenbach L.M., Kerfoot C.A. y Mazar A.P. (2010). "An anti-urokinase plasminogen activator receptor antibody (ATN-658) blocks prostate cancer invasion, migration, growth, and experimental skeletal metastasis in vitro and in vivo." *Neoplasia* 12(10): 778-788.
- Radhakrishnan N., Yadav S.P., Sachdeva A., Pruthi P.K., Sawhney S., Piplani T., Wada T. y Yachie A. (2011). "Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia." *J Pediatr Hematol Oncol* 33(1): 74-78.
- Rao J.S. (2003). "Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases." *Nat Rev Cancer* 3(7): 489-501.
- Rebouissou S., Amessou M., Couchy G., Poussin K., Imbeaud S., Pilati C., Izard T., Balabaud C., Bioulac-Sage P. y Zucman-Rossi J. (2009). "Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours." *Nature* 457(7226): 200-204.
- Ridley A.J., Schwartz M.A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M.H., Borisy G., Parsons J.T. y Horwitz A.R. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* 302(5651): 1704-1709.

- Rinaldo F., Li J., Wang E., Muders M. y Datta K. (2007). "RalA regulates vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) synthesis in prostate cancer cells during androgen ablation." *Oncogene* 26(12): 1731-1738.
- Roy A.K., Tyagi R.K., Song C.S., Lavrovsky Y., Ahn S.C., Oh T.S. y Chatterjee B. (2001). "Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction." *Ann N Y Acad Sci* 949: 44-57.
- Ruizeveld de Winter J.A., Janssen P.J., Sleddens H.M., Verleun-Mooijman M.C., Trapman J., Brinkmann A.O., Santerse A.B., Schroder F.H. y van der Kwast T.H. (1994). "Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer." *Am J Pathol* 144(4): 735-746.
- Ryter S.W. y Choi A.M. (2002). "Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress." *Antioxid Redox Signal* 4(4): 625-632.
- Ryter S.W. y Choi A.M. (2009). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy." *Am J Respir Cell Mol Biol* 41(3): 251-260.
- Sacca P., Meiss R., Casas G., Mazza O., Calvo J.C., Navone N. y Vazquez E. (2007). "Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer." *Br J Cancer* 97(12): 1683-1689.
- Samavati L., Rastogi R., Du W., Huttemann M., Fite A. y Franchi L. (2009). "STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria." *Mol Immunol* 46(8-9): 1867-1877.
- Sampson N., Untergasser G., Plas E. y Berger P. (2007). "The ageing male reproductive tract." *J Pathol* 211(2): 206-218.
- Sang M., Li Y., Ozaki T., Ono S., Ando K., Yamamoto H., Koda T., Geng C. y Nakagawara A. (2006). "p73-dependent induction of 14-3-3sigma increases the chemo-sensitivity of drug-resistant human breast cancers." *Biochem Biophys Res Commun* 347(1): 327-333.
- Saramaki O.R., Harjula A.E., Martikainen P.M., Vessella R.L., Tammela T.L. y Visakorpi T. (2008). "TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis." *Clin Cancer Res* 14(11): 3395-3400.
- Sato K., Qian J., Slezak J.M., Lieber M.M., Bostwick D.G., Bergstralh E.J. y Jenkins R.B. (1999). "Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 91(18): 1574-1580.
- Sciarra A., Mariotti G., Salciccia S., Autran Gomez A., Monti S., Toscano V. y Di Silverio F. (2008). "Prostate growth and inflammation." *J Steroid Biochem Mol Biol* 108(3-5): 254-260.
- Schwartz G.K. y Shah M.A. (2005). "Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy." *J Clin Oncol* 23(36): 9408-9421.
- Schweizer L., Rizzo C.A., Spires T.E., Platero J.S., Wu Q., Lin T.A., Gottardis M.M. y Attar R.M. (2008). "The androgen receptor can signal through Wnt/beta-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens." *BMC Cell Biol* 9: 4.
- Schwer C.I., Guerrero A.M., Humar M., Roesslein M., Goebel U., Stoll P., Geiger K.K., Pannen B.H., Hoetzel A. y Schmidt R. (2008). "Heme oxygenase-1 inhibits the proliferation of pancreatic stellate cells by repression of the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway." *J Pharmacol Exp Ther* 327(3): 863-871.
- Shariat S.F., Karam J.A., Walz J., Roehrborn C.G., Montorsi F., Margulis V., Saad F., Slawin K.M. y Karakiewicz P.I. (2008). "Improved prediction of disease relapse after radical prostatectomy through a panel of preoperative blood-based biomarkers." *Clin Cancer Res* 14(12): 3785-3791.
- Sharp V.J., Takacs E.B. y Powell C.R. (2010). "Prostatitis: diagnosis and treatment." *Am Fam Physician* 82(4): 397-406.
- Shen M.M. y Abate-Shen C. (2010). "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." *Genes Dev* 24(18): 1967-2000.
- Shodeinde A.L. y Barton B.E. (2012). "Potential use of STAT3 inhibitors in targeted prostate cancer therapy: future prospects." *Onco Targets Ther* 5: 119-125.

- Shuai K. (2006). "Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins." *Cell Res* 16(2): 196-202.
- Sikorski E.M., Hock T., Hill-Kapturczak N. y Agarwal A. (2004). "The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury." *Am J Physiol Renal Physiol* 286(3): F425-441.
- Silva C.M. (2004). "Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis." *Oncogene* 23(48): 8017-8023.
- Silver D.L., Naora H., Liu J., Cheng W. y Montell D.J. (2004). "Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility." *Cancer Res* 64(10): 3550-3558.
- Sims R.J., 3rd, Liss A.S. y Gottlieb P.D. (2003). "Normalization of luciferase reporter assays under conditions that alter internal controls." *Biotechniques* 34(5): 938-940.
- Slebos D.J., Ryter S.W., van der Toorn M., Liu F., Guo F., Baty C.J., Karlsson J.M., Watkins S.C., Kim H.P., Wang X., Lee J.S., Postma D.S., Kauffman H.F. y Choi A.M. (2007). "Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death." *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(4): 409-417.
- Smith J.L., Freebern W.J., Collins I., De Siervi A., Montano I., Haggerty C.M., McNutt M.C., Butscher W.G., Dzekunova I., Petersen D.W., Kawasaki E., Merchant J.L. y Gardner K. (2004). "Kinetic profiles of p300 occupancy in vivo predict common features of promoter structure and coactivator recruitment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(32): 11554-11559.
- Soares M.P. y Bach F.H. (2007). "Heme oxygenase-1 in organ transplantation." *Front Biosci* 12: 4932-4945.
- Soares M.P. y Bach F.H. (2009). "Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential." *Trends Mol Med* 15(2): 50-58.
- Soares M.P., Usheva A., Brouard S., Berberat P.O., Gunther L., Tobiasch E. y Bach F.H. (2002). "Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide." *Antioxid Redox Signal* 4(2): 321-329.
- Song H., Zhang B., Watson M.A., Humphrey P.A., Lim H. y Milbrandt J. (2009). "Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis." *Oncogene* 28(37): 3307-3319.
- St John J., Powell K., Conley-Lacomb M.K. y Chinni S.R. (2012). "TMPRSS2-ERG Fusion Gene Expression in Prostate Tumor Cells and Its Clinical and Biological Significance in Prostate Cancer Progression." *J Cancer Sci Ther* 4(4): 94-101.
- Stan S.D. y Singh S.V. (2009). "Transcriptional repression and inhibition of nuclear translocation of androgen receptor by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells." *Clin Cancer Res* 15(15): 4895-4903.
- Stanbrough M., Bubley G.J., Ross K., Golub T.R., Rubin M.A., Penning T.M., Febbo P.G. y Balk S.P. (2006). "Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer." *Cancer Res* 66(5): 2815-2825.
- Stark G.R. y Darnell J.E., Jr. (2012). "The JAK-STAT pathway at twenty." *Immunity* 36(4): 503-514.
- Steinkamp M.P., O'Mahony O.A., Brogley M., Rehman H., Lapensee E.W., Dhanasekaran S., Hofer M.D., Kuefer R., Chinnaiyan A., Rubin M.A., Pienta K.J. y Robins D.M. (2009). "Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy." *Cancer Res* 69(10): 4434-4442.
- Sunamura M., Duda D.G., Ghattas M.H., Lozonschi L., Matoi F., Yamauchi J., Matsuno S., Shibahara S. y Abraham N.G. (2003). "Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer." *Angiogenesis* 6(1): 15-24.
- Sung S.Y., Hsieh C.L., Wu D., Chung L.W. y Johnstone P.A. (2007). "Tumor microenvironment promotes cancer progression, metastasis, and therapeutic resistance." *Curr Probl Cancer* 31(2): 36-100.

- Suttner D.M., Sridhar K., Lee C.S., Tomura T., Hansen T.N. y Dennery P.A. (1999). "Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells." *Am J Physiol* 276(3 Pt 1): L443-451.
- Tam L., McGlynn L.M., Traynor P., Mukherjee R., Bartlett J.M. y Edwards J. (2007). "Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer." *Br J Cancer* 97(3): 378-383.
- Tang Y.L., Tang Y., Zhang Y.C., Qian K., Shen L. y Phillips M.I. (2004). "Protection from ischemic heart injury by a vigilant heme oxygenase-1 plasmid system." *Hypertension* 43(4): 746-751.
- Tenhunen R., Marver H.S. y Schmid R. (1969). "Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme." *J Biol Chem* 244(23): 6388-6394.
- Terazawa R., Garud D.R., Hamada N., Fujita Y., Itoh T., Nozawa Y., Nakane K., Deguchi T., Koketsu M. y Ito M. (2010). "Identification of organoselenium compounds that possess chemopreventive properties in human prostate cancer LNCaP cells." *Bioorg Med Chem* 18(19): 7001-7008.
- Thapa D. y Ghosh R. (2012). "Antioxidants for prostate cancer chemoprevention: challenges and opportunities." *Biochem Pharmacol* 83(10): 1319-1330.
- Thavathiru E. y Das G.M. (2001). "Activation of pRL-TK by 12S E1A oncoprotein: drawbacks of using an internal reference reporter in transcription assays." *Biotechniques* 31(3): 528-530, 532.
- Tibullo D., Barbagallo I., Giallongo C., La Cava P., Parrinello N., Vanella L., Stagno F., Palumbo G.A., Li Volti G. y Di Raimondo F. (2012). "Nuclear translocation of heme oxygenase-1 confers resistance to Imatinib in chronic myeloid leukemia cells." *Curr Pharm Des.*
- Tomlins S.A., Rubin M.A. y Chinnaiyan A.M. (2006). "Integrative biology of prostate cancer progression." *Annu Rev Pathol* 1: 243-271.
- Toritsu-Itakura H., Furue M., Kuwano M. y Ono M. (2000). "Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas." *Jpn J Cancer Res* 91(9): 906-910.
- Tosoian J. y Loeb S. (2010). "PSA and beyond: the past, present, and future of investigative biomarkers for prostate cancer." *ScientificWorldJournal* 10: 1919-1931.
- Traish A.M. y Morgentaler A. (2009). "Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potential molecular switch for tumour growth." *Br J Cancer* 101(12): 1949-1956.
- Tsuji M.H., Yanagawa T., Iwasa S., Tabuchi K., Onizawa K., Bannai S., Toyooka H. y Yoshida H. (1999). "Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis." *Cancer Lett* 138(1-2): 53-59.
- Tzima S., Victoratos P., Kranidioti K., Alexiou M. y Kollias G. (2009). "Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production." *J Exp Med* 206(5): 1167-1179.
- Ueda T., Bruchofsky N. y Sadar M.D. (2002). "Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways." *J Biol Chem* 277(9): 7076-7085.
- Van der Meer S., Lowik S.A., Hirdes W.H., Nijman R.M., Van der Meer K., Hoekstra-Weebers J.E. y Blanker M.H. (2012). "Prostate specific antigen testing policy worldwide varies greatly and seems not to be in accordance with guidelines: a systematic review." *BMC Fam Pract* 13: 100.
- van Leenders G., Dijkman H., Hulsbergen-van de Kaa C., Ruiters D. y Schalken J. (2000). "Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy." *Lab Invest* 80(8): 1251-1258.
- van Leenders G.J. y Schalken J.A. (2003). "Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* 46 Suppl: S3-10.

- Vulapalli S.R., Chen Z., Chua B.H., Wang T. y Liang C.S. (2002). "Cardioselective overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(2): H688-694.
- Walker L., Millena A.C., Strong N. y Khan S.A. (2013). "Expression of TGFbeta3 and its effects on migratory and invasive behavior of prostate cancer cells: involvement of PI3-kinase/AKT signaling pathway." *Clin Exp Metastasis* 30(1): 13-23.
- Wang G., Hamid T., Keith R.J., Zhou G., Partridge C.R., Xiang X., Kingery J.R., Lewis R.K., Li Q., Rokosh D.G., Ford R., Spinale F.G., Riggs D.W., Srivastava S., Bhatnagar A., Bolli R. y Prabhu S.D. (2010). "Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart." *Circulation* 121(17): 1912-1925.
- Wang W., Bergh A. y Damber J.E. (2009). "Morphological transition of proliferative inflammatory atrophy to high-grade intraepithelial neoplasia and cancer in human prostate." *Prostate* 69(13): 1378-1386.
- Wang X.L., Kong F., Shen T., Young C.Y., Lou H.X. y Yuan H.Q. (2011). "Sesquiterpenoids from myrrh inhibit androgen receptor expression and function in human prostate cancer cells." *Acta Pharmacol Sin* 32(3): 338-344.
- Was H., Cichon T., Smolarczyk R., Rudnicka D., Stopa M., Chevalier C., Leger J.J., Lackowska B., Grochot A., Bojkowska K., Ratajska A., Kieda C., Szala S., Dulak J. y Jozkowicz A. (2006). "Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice." *Am J Pathol* 169(6): 2181-2198.
- Was H., Dulak J. y Jozkowicz A. (2010). "Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy." *Curr Drug Targets* 11(12): 1551-1570.
- Wegiel B., Chin B.Y. y Otterbein L.E. (2008). "Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation." *Cell Cycle* 7(10): 1379-1384.
- Weiss T.W., Simak R., Kaun C., Rega G., Pfluger H., Maurer G., Huber K. y Wojta J. (2011). "Oncofostatin M and IL-6 induce u-PA and VEGF in prostate cancer cells and correlate in vivo." *Anticancer Res* 31(10): 3273-3278.
- Williams S.A., Jelinek C.A., Litvinov I., Cotter R.J., Isaacs J.T. y Denmeade S.R. (2011). "Enzymatically active prostate-specific antigen promotes growth of human prostate cancers." *Prostate* 71(15): 1595-1607.
- Wormald S. y Hilton D.J. (2004). "Inhibitors of cytokine signal transduction." *J Biol Chem* 279(2): 821-824.
- Xia Z.W., Zhong W.W., Meyrowitz J.S. y Zhang Z.L. (2008). "The role of heme oxygenase-1 in T cell-mediated immunity: the all encompassing enzyme." *Curr Pharm Des* 14(5): 454-464.
- Xu D., McKee C.M., Cao Y., Ding Y., Kessler B.M. y Muschel R.J. (2010). "Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1." *Cancer Res* 70(17): 6988-6998.
- Yachie A., Niida Y., Wada T., Igarashi N., Kaneda H., Toma T., Ohta K., Kasahara Y. y Koizumi S. (1999). "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency." *J Clin Invest* 103(1): 129-135.
- Yamamoto T., Matsuda T., Junicho A., Kishi H., Saatcioglu F. y Muraguchi A. (2000). "Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and estrogen receptor signaling." *FEBS Lett* 486(2): 143-148.
- Yamamoto T., Matsuda T., Muraguchi A., Miyazono K. y Kawabata M. (2001). "Cross-talk between IL-6 and TGF-beta signaling in hepatoma cells." *FEBS Lett* 492(3): 247-253.
- Yamamoto T., Sato N., Sekine Y., Yumioka T., Imoto S., Junicho A., Fuse H. y Matsuda T. (2003). "Molecular interactions between STAT3 and protein inhibitor of activated STAT3, and androgen receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 306(2): 610-615.
- Yamashita S., Miyagi C., Fukada T., Kagara N., Che Y.S. y Hirano T. (2004). "Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer." *Nature* 429(6989): 298-302.

- Yang G., Nguyen X., Ou J., Rekulapelli P., Stevenson D.K. y Dennerly P.A. (2001). "Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis." *Blood* 97(5): 1306-1313.
- Yang J., Liao X., Agarwal M.K., Barnes L., Auron P.E. y Stark G.R. (2007). "Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB." *Genes Dev* 21(11): 1396-1408.
- Yang L., Wang L., Lin H.K., Kan P.Y., Xie S., Tsai M.Y., Wang P.H., Chen Y.T. y Chang C. (2003). "Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 305(3): 462-469.
- Yin Y., Liu Q., Wang B., Chen G., Xu L. y Zhou H. (2012). "Expression and function of heme oxygenase-1 in human gastric cancer." *Exp Biol Med (Maywood)* 237(4): 362-371.
- Yoon S., Woo S.U., Kang J.H., Kim K., Shin H.J., Gwak H.S., Park S. y Chwae Y.J. (2012). "NF-kappaB and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells." *Oncogene* 31(29): 3467-3481.
- Yoshinaga T., Sassa S. y Kappas A. (1982). "Purification and properties of bovine spleen heme oxygenase. Amino acid composition and sites of action of inhibitors of heme oxidation." *J Biol Chem* 257(13): 7778-7785.
- Yu H., Kortylewski M. y Pardoll D. (2007). "Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment." *Nat Rev Immunol* 7(1): 41-51.
- Yu H., Pardoll D. y Jove R. (2009). "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3." *Nat Rev Cancer* 9(11): 798-809.
- Yuan X. y Balk S.P. (2009). "Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration." *Urol Oncol* 27(1): 36-41.
- Zalazar F. (2009). Tesina de Licenciatura: Regulación transcripcional del Antígeno Prostático Específico (PSA). Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Zhang J., Denton B.T., Balasubramanian H., Shah N.D. y Inman B.A. (2012). "Optimization of PSA screening policies: a comparison of the patient and societal perspectives." *Med Decis Making* 32(2): 337-349.
- Zhang L., Altuwajri S., Deng F., Chen L., Lal P., Bhanot U.K., Korets R., Wenske S., Lilja H.G., Chang C., Scher H.I. y Gerald W.L. (2009). "NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth." *Am J Pathol* 175(2): 489-499.
- Zhang M.Z. y Lu Y.P. (2012). "From pro-prostate specific antigen, [-2]pro-prostate specific antigen to Beckman Coulter phi: the evolution of new biomarkers for early detection of prostatic carcinoma." *Chin Med J (Engl)* 125(9): 1643-1649.
- Zhang X., Shan P., Jiang G., Zhang S.S., Otterbein L.E., Fu X.Y. y Lee P.J. (2006). "Endothelial STAT3 is essential for the protective effects of HO-1 in oxidant-induced lung injury." *FASEB J* 20(12): 2156-2158.
- Zhang Z., Jones S., Hagood J.S., Fuentes N.L. y Fuller G.M. (1997). "STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling." *J Biol Chem* 272(49): 30607-30610.
- Zhou C., Wu G., Feng Y., Li Q., Su H., Mais D.E., Zhu Y., Li N., Deng Y., Yang D. y Wang M.W. (2008). "Discovery and biological characterization of a novel series of androgen receptor modulators." *Br J Pharmacol* 154(2): 440-450.
- Zhu M.L. y Kyprianou N. (2008). "Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells." *Endocr Relat Cancer* 15(4): 841-849.
- Zhu M.L., Partin J.V., Bruckheimer E.M., Strup S.E. y Kyprianou N. (2008). "TGF-beta signaling and androgen receptor status determine apoptotic cross-talk in human prostate cancer cells." *Prostate* 68(3): 287-295.
- Zou Z., Zeng F., Xu W., Wang C., Ke Z., Wang Q.J. y Deng F. (2012). "PKD2 and PKD3 promote prostate cancer cell invasion by modulating NF-kappaB- and HDAC1-mediated expression and activation of uPA." *J Cell Sci* 125(Pt 20): 4800-4811.

- Zoubeidi A., Rocha J., Zouanat F.Z., Hamel L., Scarlata E., Aprikian A.G. y Chevalier S. (2009). "The Fer tyrosine kinase cooperates with interleukin-6 to activate signal transducer and activator of transcription 3 and promote human prostate cancer cell growth." *Mol Cancer Res* 7(1): 142-155.
- Zwirner N.W., Croci D.O., Domaica C.I. y Rabinovich G.A. (2010). "Overcoming the hurdles of tumor immunity by targeting regulatory pathways in innate and adaptive immune cells." *Curr Pharm Des* 16(3): 255-267.
- Zynger D.L. y Yang X. (2009). "High-grade prostatic intraepithelial neoplasia of the prostate: the precursor lesion of prostate cancer." *Int J Clin Exp Pathol* 2(4): 327-338.