



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
Maestría en Investigación Biomédica



TESIS DE MAESTRÍA

**PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO 20-HIDROXIEICOSATETRAENÓICO
(20-HETE) EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN CELULAS DE CÁNCER DE
PRÓSTATA**

Lic. en Ciencias Química Elena Sofía Cárdenas Alcóser

Director: Dra. Susana Nowicki

Co-director: Dra. Magali Pellon Maison

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá”
(CEDIE) (CONICET-CABA-FEI), Hospital de Niños “Ricardo Gutierrez”

PUBLICACIONES

Los resultados de la presente tesis han sido ya parcialmente publicados en el siguiente trabajo:

Revista: Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Molecular and cell biology of lipids– Elsevier.

Título: GPR75 receptor mediates 20-HETE-signaling and metastatic features of androgen-insensitive prostate cancer cells.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158573>

ISSN: 1388-1981

Volumen: 1865

Edición: 2

Fecha de publicación: 5 de noviembre de 2019

*Para todo aquel que está a punto de rendirse,
hay una luz al final del túnel esperando por ti*

“Aquel que tiene un porqué para vivir se puede enfrentar a todos los cómo”

Friedrich Nietzsche



ÍNDICE

ÍNDICE	I
FIGURAS.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	XII
ABREVIATURAS	XV
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Ácido 20-Hidroxieicosatetranóico (20-HETE).....	1
1.1. Vía de la ciclooxigenasa (COX).....	3
1.2. Vía de la lipoxigenasa (LOX).....	4
1.3. Vía del Citocromo P450 (CYP450).....	4
1.3.1. CYPs con actividad de epoxigenasas	5
1.3.2. CYPs con actividad de 20-hidroxilasas.	6
1.3.3. 20-HETE, efectos y mecanismos de acción	6
1.3.3.1. Receptor GPR75.....	7
2. Cáncer	10
2.1. Definición	10
2.2. Ciclo celular	11
2.3. Desarrollo de metástasis.....	13
2.3.1. Disociación celular del tumor primario.....	16
2.3.2. Invasión celular	16
2.3.3. Intravasación.....	18
2.3.4. Extravasación	18
2.4. Expresión de 20-hidroxilasas en tumores.....	19
2.4.1. Efectos protumorigénicos del 20-HETE.....	20
2.4.1.1. Impacto sobre la proliferación	22
2.4.1.2. Impacto sobre la metástasis.....	22

2.4.1.3.	Impacto sobre la angiogénesis.....	23
3.	Cáncer de Próstata	23
3.1.	Función e histología de la próstata normal.....	23
3.2.	Datos epidemiológicos del Cáncer de Próstata	25
3.3.	Receptor de Andrógenos (RA)	26
3.3.1.	Función del RA en el Cáncer de Próstata	28
3.3.2.	Cáncer de Próstata resistente a la castración (CRPC).....	29
3.4.	20-HETE y Cáncer de Próstata.....	31
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	32
	MATERIALES Y MÉTODOS	33
1.	Materiales	33
1.1.	Drogas y Reactivos	33
1.2.	Composición de los Buffers utilizados	34
1.3.	Medios utilizados en cultivo celular	36
1.4.	Reactivos para cultivo de bacterias	36
1.5.	Anticuerpos	37
1.6.	Plásmidos	38
1.7.	Líneas celulares.....	38
2.	Métodos	39
2.1.	Mantenimiento de las células en cultivo	39
2.2.	Caracterización del Receptor GPR75.....	40
2.2.1.	Inmunodetección por Western Blot.....	40
2.3.	Interacción entre el RA y el eje 20-HETE-GPR75	41
2.3.1.	Expresión del RA	41
2.3.2.	Translocación del RA.....	41
2.3.3.	Cuantificación de antígeno prostático específico (PSA)	42
2.3.4.	Ensayo del gen reportero para expresión de PSA.....	42
2.3.4.1.	Amplificación de los vectores de expresión	42

2.3.4.1.1. Preparación de bacterias competentes	42
2.3.4.1.2. Transfección de bacterias competentes.....	43
2.3.4.1.3. Aislamiento del ADN plasmídico	43
2.3.4.2. Ensayo de gen reportero.....	43
2.3.4.2.1. Transfección de células con el gen reportero.....	43
2.3.4.2.2. Ensayo de actividad de luciferasa.....	44
2.4. Ensayos in-vitro para evaluar la capacidad metastásica	44
2.4.1. Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) – Inmunodetección de e-caderina y vimentina.....	44
2.4.2. Actividad de Metaloproteasas de Matriz – Zimografía	45
2.4.3. Caracterización de proteínas involucradas en el citoesqueleto	46
2.4.4. Migración celular – Ensayo de cierre de herida	46
2.5. Señalización intracelular	47
2.5.1. Inmunodetección por Western Blot de proteínas fosforiladas	47
2.5.2. Distribución intracelular de proteínas	48
2.6. Métodos generales.....	48
2.6.1. Obtención de homogenatos celulares	48
2.6.2. Fraccionamiento celular membrana, citoplasma y núcleo	49
2.6.3. Inmunodetección de proteínas	49
2.6.3.1. Cuantificación de proteínas totales.....	49
2.6.3.2. Separación por electroforesis – Western Blot.....	50
2.6.3.3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	51
2.7. Análisis estadístico de los datos.....	52
RESULTADOS	53
1. Caracterización del Receptor GPR75 en Células de Cáncer de Próstata.....	53
2. Células sensibles a andrógenos (LNCaP).....	54
2.1. Modulación de la expresión del Receptor GPR75	54
2.2. Acciones intracelulares del 20-HETE	55

2.2.1.	Modulación de la expresión de receptor de andrógenos por el 20-HETE	55
2.2.2.	Efectos del 20-HETE sobre la distribución intracelular del receptor de andrógenos.....	56
2.2.3.	Efectos del 20-HETE sobre la actividad transcripcional del Receptor de Andrógenos.....	59
2.2.3.1.	Ensayo del Gen Reportero.....	59
2.2.3.2.	Determinación de PSA.....	61
3.	Células no sensibles a los andrógenos (PC-3).....	61
3.1.	Efecto del 20-HETE sobre la expresión del receptor GPR75	61
3.2.	Señales intracelulares activadas por el 20-HETE en células PC-3. Rol del receptor GPR75	62
3.2.1.	Sobreexpresión de HIC-5.....	63
3.2.2.	Activación de cascadas de señalización oncogénicas por el 20-HETE	64
3.3.	Acciones del 20-HETE sobre las características asociadas a la capacidad metastásica in vitro en células PC-3. Rol del receptor GPR75.	70
3.3.1.	Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) – Inmunodetección de e-caderina y vimentina.....	70
3.3.2.	Actividad de Metaloproteasas de Matriz – Zimografía	72
3.3.3.	Reestructuración del citoesqueleto celular	73
3.3.4.	Migración celular – Ensayo de cierre de herida	75
	DISCUSIÓN.....	79
	Células sensibles a andrógenos (LNCaP).....	81
	Células no sensibles a andrógenos (PC-3).....	83
	CONCLUSIÓN.....	88
	BIBLIOGRAFÍA.....	89

FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido araquidónico (AA).....	1
Figura 2. Vías metabólicas del ácido araquidónico.	3
Figura 3. Receptor GPR75.....	9
Figura 4. Transformaciones generales de la progresión tumoral.....	11
Figura 5. Fases del ciclo celular y dinámica de expresión de ciclinas..	12
Figura 6. Desarrollo de metástasis en tumores epiteliales..	15
Figura 7. Efectos protumorogénicos del 20-HETE.	21
Figura 8. Morfología prostática.	24
Figura 9. Receptor de andrógenos (RA), activación y dominios.....	27
Figura 10. Actividad aberrante del RA en el CRPC.....	30
Figura 11. Expresión del Receptor GPR75.	54
Figura 12. Efectos del 20-HETE sobre la modificación del receptor GPR75 en células LNCaP.....	55
Figura 13. Efectos del 20-HETE sobre la expresión del receptor de andrógenos.....	56
Figura 14. Curso temporal de la redistribución del receptor de andrógenos hacia el núcleo.....	59
Figura 15. Efectos del 20-HETE sobre la actividad transcripcional del receptor de andrógenos.....	60
Figura 16. Efecto del 20-HETE sobre la secreción de PSA.....	61
Figura 17. Efecto del 20-HETE sobre la expresión del receptor GPR75 en células PC-3.....	62
Figura 18. Efecto del 20-HETE sobre la expresión de HIC-5..	64
Figura 19. Fosforilación de proteínas.....	66
Figura 20. Redistribución celular de AKT y p-AKT.	68
Figura 21. Redistribución celular de NF-kB.....	68

Figura 22. Redistribución celular PKC- α	70
Figura 23. Marcadores de transición Epitelio Mesenquimal.	72
Figura 24. Actividad de MMP-2.....	72
Figura 25. Reestructuración del citoesqueleto celular.....	74
Figura 26. Migración celular.....	78

AGRADECIMIENTOS

Inicio agradeciendo a las personas más importantes de mi vida, mi familia. A mi mamá Silvana por cada palabra de aliento que recibí de su parte y por todas las veces que me salvó, aun poniéndose ella en aprietos. A mi papá Jorge, cuyo apoyo incondicional para mi crecimiento es incuestionable. A mi hermano David que siempre pone el pecho contra las balas para que yo pueda cumplir mis sueños. A mi abuela Blanca por cada abrazo enviado desde la distancia, y a cada miembro de mi familia que me tiene en su mente y me manda sus deseos desde tan lejos.

A mi directora de tesis y amiga Dra. Susana Nowicki, que me tomó como un polluelo asustado entre sus alas y me enseñó a volar alto. Creo que aun dejando estas palabras indelebles en este documento no logro expresar el agradecimiento que siento para ella, el honor tan grande de haberla conocido y estudiado bajo su tutela.

A Mariana Cruz, por ser una amiga incondicional y transitar este tortuoso viaje de esta Maestría juntas.

A todas las chicas del Laboratorio 13, cada una de ustedes pasó a formar parte de mi corazón, y su apoyo en cada uno de los pasos que he dado me permitió seguir en pie.

A mis amigos Tec y Reven que, desde la distancia, día a día, me permitieron una válvula de liberación de presión y me mostraron una forma de disfrutar libremente.

Agradezco a las Dras. Mónica Costas y Laura Panelo del Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, IDIM-CONICET, por enseñarme tanto de inmunofluorescencia y ayudarme a resolver los problemas que iban surgiendo cada tanto.

Agradezco al Centro de Investigaciones endocrinológicas “Dr. Cesar Bergadá” (CEDIE-CONICET) por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones brindándome acceso a todo el equipamiento necesario.

Agradezco a la Dra. Magalí Pellón Maison por su guía como codirectora de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Elba Vazquez del Laboratorio de Inflamación y Cáncer del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (IQUIBICEN)-CONICET por cederme el plásmido PSA-Luc que salvó una parte de esta tesis.

Finalmente, mi sincero agradecimiento a cada una de las personas que no están nombradas aquí, pero estuvieron para mí cuando más los necesité en este viaje.

RESUMEN

El ácido 20-hidroxi-eicosatetraenoico (20-HETE) es el producto del metabolismo del ácido araquidónico por las isoformas con actividad 20-hidroxilasas del citocromo P450 (CYP4F2 y CYP4A11) y se ha demostrado que cumple un rol importante en la biología de diferentes tumores humanos. Recientemente, el receptor acoplado a proteína G, GPR75, fue identificado como blanco para el 20-HETE en células endoteliales humanas. Por otro lado, datos previos de nuestro laboratorio demostraron que la inhibición de la síntesis de 20-HETE disminuye significativamente la viabilidad de células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (LNCaP) a través de la interacción con la vía del receptor de andrógenos (RA). Así, el objetivo de este trabajo fue indagar sobre los mecanismos intracelulares comprometidos en las acciones protumorigénicas del 20-HETE en células de cáncer de próstata de origen humano, planteando como objetivos específicos: determinar si el 20-HETE modifica la actividad transcripcional del receptor de andrógenos en células de cáncer de próstata sensibles a los andrógenos, e identificar posibles vías intracelulares activadas por el 20-HETE en células de cáncer de próstata no sensibles a los andrógenos.

A tal fin, se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de próstata humano, una sensible a andrógenos (LNCaP) y otra línea no sensible a andrógenos (PC-3). Las células fueron incubadas con vehículo (control) o estimuladas con 20-HETE (0.1 nM) en presencia o ausencia de dos antagonistas del receptor GPR75: aspartato de sodio 19(R)-hidroxieicosa-5(Z), 14 (Z)-L-dienol (19-HEDE) o aspartato de sodio ((6Z, 15Z)-20-hidroxi-eicosa-6,15-dienol (AAA) (5 o 10 μ M para ambos); o con el agonista del RA, 5 α -dihidrotestosterona (DHT 10 nM).

Se utilizaron las siguientes técnicas: western blot para determinar la expresión de proteínas totales o fosforiladas. Inmunofluorescencia indirecta y/o fraccionamiento celular para evaluar la distribución subcelular de proteínas o cambios del citoesqueleto.

Medición del antígeno prostático específico (PSA), cuya producción está bajo regulación del RA. Ensayo del gen reportero con un vector del PSA acoplado a luciferasa para evaluar la actividad transcripcional del RA. Ensayo de cierre de herida para la evaluación de la migración celular, y zimografía para la determinación de la actividad de la metaloproteasa de matriz- 2 (MMP-2). El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el test de Student, o bien ANOVA de una vía, seguida de análisis por Tuckey.

En primer lugar, se constató en ambas líneas celulares la expresión del receptor GPR75. Como ocurre con otros receptores asociados a proteína G, se observó una disminución significativa en su expresión después del estímulo con el agonista 20-HETE ($p < 0.0001$ vs. control para LNCaP (36 h) y PC-3 (12 h)).

En las células LNCaP se estudió el efecto del 20-HETE sobre algunos mecanismos dependientes del RA. El estímulo con 20-HETE (0.1 nM) incrementó la expresión del RA en un 37.35% ($p < 0.01$ vs control, 36 h), la presencia nuclear del RA en un 62.8% ($p < 0.0001$ vs control, 45 min), la actividad transcripcional del RA en 178% ($p < 0.0001$ vs control, 36 h) y la secreción de PSA en un 58% ($p < 0.05$ vs control, 36 h), siendo estas respuestas dependientes del receptor GPR75. La coincubación (36 h) con 20-HETE (0.1 nM) y DHT (10 nM) dio como resultado un efecto sinérgico en la actividad transcripcional del RA medido como un aumento del 58% sobre la señal de luciferasa obtenida con DHT sola ($p < 0.0001$ vs DHT).

En células PC-3 se indagaron los mecanismos independientes del RA. El estímulo con 20-HETE (0.1 nM) aumentó la expresión de la proteína clon-5 inducible por peróxido de hidrogeno (HIC-5) en 150% ($p < 0.0001$ vs control, 12 h). Asimismo, incrementó la fosforilación (y consecuente activación) de varias moléculas de señalización intracelular tales como: EGFR (Tyr 1092), NF- κ B (Ser 536) y Akt (Ser 473) en 146, 172 y 219% respectivamente ($p < 0.01$ para NF- κ B, y $p < 0.001$ para EGFR y AKT vs. Control, 2 hs). Además, el 20-HETE promovió la redistribución de p-Akt ($p < 0.01$ vs control, 1h) hacia el núcleo, y de PKC α del núcleo ($p < 0.05$ vs control, 10 min) a la fracción de membranas

($p < 0.01$ vs control, 10 min). También, la presencia de 20-HETE (0.1 nM) promovió la transición epitelio mesenquimal (TEM) a través de la disminución en la expresión de e-caderina en un 40% ($p < 0.0001$ vs control, 24 h) y el aumento de la vimentina en 150% ($p < 0.0001$ vs control, 24 h), e incrementó la actividad de MMP-2 en 52% ($p < 0.05$ vs control, 24 h). Respecto de la remodelación del citoesqueleto, el 20-HETE aumentó las fibras de estrés de F-actina, e incrementó la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK) (Tyr 397) en 89% ($p < 0.0001$ vs. Control, 24 h). Los ensayos funcionales mostraron que el 20-HETE aumentó el porcentaje de migración celular del 48,9% ($p < 0.0001$ vs control, 16hs). La inhibición de las vías de: PKC (RO318220, 100 nM), PI3K/AKT (LY194002, 25 mM) y NF- κ B (sulfasalazina, 500 μ M) disminuyeron el porcentaje de migración celular activado por el 20-HETE en 37.3, 33.0 y 24.8% respectivamente (RO318220 $p < 0.001$, LY294002 y sulfasalazina $p < 0.0001$ vs. 20-HETE solo, 16 h). Más aun, la inhibición de PI3K/AKT y NF- κ B disminuyó la migración celular *per se* ($p < 0.01$ y $p < 0.0001$ vs. control respectivamente).

El antagonista del receptor GPR75 (AAA, 10 μ M) revirtió todos los efectos del 20-HETE. Más aún, el antagonista por si solo aumentó la fosforilación de p-38 (Tyr 182) en 248% ($p < 0.0001$ vs control, 2 h), disminuyó la presencia nuclear de Akt, p-Akt y NF- κ B (Akt $p < 0.01$, p-Akt y NF- κ B $p < 0.0001$ vs control, 1h).

Los resultados del presente trabajo de tesis proveen evidencias sobre los mecanismos intracelulares comprometidos en las acciones protumorigénicas del 20-HETE en células de cáncer de próstata y demuestran que ellas requieren del estímulo del receptor GPR75. De esta manera, el antagonismo del receptor GPR75 podría ser considerado en el futuro como una interesante y novedosa diana terapéutica para el tratamiento de cáncer de próstata.

ABSTRACT

20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE), the product of 20-hydroxylation of arachidonic acid by cytochrome P450 isoforms (CYP4F2 and CYP4A11), has a role in the oncogenesis of several human tumors. Recently, the G-protein coupled receptor GPR75 has been identified as the target for 20-HETE in human endothelial cells. Our laboratory has previously shown that 20-HETE mediates the viability of androgen-dependent prostate cancer cells (LNCaP) acting as a signaling molecule in the androgen receptor (AR) pathway. The aim of this study was to explore the intracellular mechanisms involved in the protumorigenic actions of 20-HETE in human prostate cancer cells. The specific aims of this work were: 1. to determine the role of 20-HETE in the transcriptional activity of the AR in androgen sensitive prostate cancer cells, and, 2. to identify the intracellular pathways activated by 20-HETE in androgen independent prostate cancer cells.

Two different prostate cancer cells lines were used: the androgen- sensitive cell line (LNCaP) and the androgen- insensitive cell line (PC-3). Cells were incubated with vehicle (control) or with 20-HETE (0.1 nM) in the presence or absence of two different antagonists of the 20-HETE receptor, GPR75: sodium ((6Z,15Z)-N-(20-hydroxyeicosa-6(Z),15(Z)-dienoyl) aspartate (AAA), or sodium 19(R)-hydroxyeicosa-5(Z) 14(Z)-dienoyl-L-aspartate (19-HEDE) (both 5 or 10 μ M); or with the AR agonist, 5 α -dihydrotestosterone (DHT 10 nM).

The following assays were performed: Western Blot for total or phosphorylated protein expression and indirect immunofluorescence or subcellular fractionation for identifying subcellular protein distribution and changes in cell cytoskeleton.

For the evaluation of the transcriptional activity of AR both, the reporter gene assay using a construct vector including a prostate specific antigen (PSA, a gen under AR regulation)

promoter and luciferase as the reporter gene, and direct quantification of PSA release into the conditioned medium were performed. Scratch wound healing assay was used for the evaluation of cell migration, and zymography assay for studying the activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). Results were analyzed using t-student test or one-way ANOVA followed by Tuckey's.

First, the expression of GPR75 receptor was confirmed in PC-3 and LNCaP cells. As previously reported for other G-protein coupled receptors, incubation with the agonist, 20-HETE (0.1 nM, 36 h and 12 h for PC-3 and LNCaP cells respectively) reduced the expression of GPR75 in both cells lines ($p < 0.0001$ vs control for both).

The effects of 20-HETE on AR dependent mechanisms were studied in LNCaP cells. Incubation with 20-HETE (0.1 nM) increased AR expression by 37,35% ($p < 0.01$ vs control, 36 h), the nuclear abundance of AR by 62,6% ($p < 0.0001$ vs control, 45 min), the luciferase signal by 178% ($p < 0.0001$ vs control, 36 h), and PSA secretion by 58% ($p < 0.05$ vs control, 36 h). These results were reverted by coincubation with the GPR75 antagonist, 19-HEDE. Coincubation of 20-HETE (0.1 nM) and DHT (10 nM, 36h) resulted in a synergistic effect. Indeed, 20-HETE increased by 58% the luciferase signal promoted by DHT alone ($p < 0.0001$ vs DHT alone).

As for the AR- independent mechanisms triggered by 20-HETE, they were analyzed in PC-3 cells. Incubation with 20-HETE (0.1 nM) induced the Peroxide-Inducible Clone 5 Protein (HIC-5) expression by 150% ($p < 0.0001$ vs control, 12 h). Besides, 20-HETE increased the phosphorylation (and activation) of intracellular signaling molecules like: EGFR (Tyr 1092), NF-kB (Ser 536) and AKT (Ser 473) by 146%, 172% and 219%, respectively (vs control, $p < 0.01$ for NF-kB, and $p < 0.001$ for EGFR and AKT, 2 h). Also, 20-HETE promoted the nuclear redistribution of p-AKT ($p < 0.01$ vs control, 1 h),

diminished the nuclear signal of PKC α ($p < 0.05$ vs control, 10 min) and increased the expression of PKC α in the membrane fraction ($p < 0.01$ vs control, 10 min).

Furthermore, 20-HETE (0.1 nM) promoted the epithelial mesenchymal transition (EMT) by the reduction of the expression of e-cadherine by 40% ($p < 0.0001$ vs control, 24 h) while increasing the one of vimentin by 150% ($p < 0.0001$ vs control, 24 h), and induced MMP-2 activity by 52% ($p < 0.05$ vs. control, 24 h). Moreover, 20-HETE boosted the remodeling of the cytoskeleton by the promotion of the F-actin stress fibers, and increased the phosphorylation of FAK (Y397) by 89% ($p < 0.0001$ vs control, 24 h). Functional tests showed that 20-HETE induces cell migration by 48.9 % ($p < 0.0001$ vs control, 16 h). The inhibition of the pathways which had been found to be activated by 20-HETE: PKC (RO318220, 100 nM), PI3K/AKT (LY194002, 25 mM) and NF-kB (sulfasalazine, 500 mM), diminished the cellular migration activated by 20-HETE by 37.3, 33.0 and 24.8% respectively (RO318220 $p < 0.001$, LY294002 and sulfasalazine $p < 0.0001$ vs. 20-HETE alone, 16 h). Moreover, the sole inhibition of PI3K/ATK or NF-kB reduced cellular migration *per se* ($P < 0.01$ and $p < 0.0001$ vs. control respectively).

Incubation with the antagonist of GPR75, AAA (10 μ M) reverted all the effects triggered by 20-HETE. Moreover, AAA alone increased the phosphorylation of p-38 (Tyr 182) by 248 % ($p < 0.0001$ vs control, 2 h), reduced the nuclear signal of AKT, p- AKT and NF-kB (AKT $p < 0.01$, p- AKT and NF-kB $p < 0.0001$ vs control, 1 h).

Taken together, our results show evidence for the intracellular mechanisms involved in the protumorigenic actions of 20-HETE in human prostate cancer cells and prove the role of GPR75 in these events.

Thus, in the future, the antagonism of GPR75 receptor might be considered as an interesting and novel therapeutic target for prostate cancer treatment.

ABREVIATURAS

11,12-EET	Ácido 11,12-epoxieicosatetranoico
12-LOX	Lipoxigenasa-12
14,15-EET	Ácido 14,15-epoxieicosatetranoico
15-LOX	Lipoxigenasa-15
19-HEDE	Aspartato de sodio 19(R)-hidroxieicosa-5(Z), 14 (Z)-L-dienol
1-ABT	1-Aminobenzotriazol
20-COOH-AA	Ácido 20-carboxieicosatetranoico
20-HETE	Ácido 20-hidroxieicosatetranoico
20-OH-PGE ₂	20-hidroxi-prostaglandina E2
5,6-EET	Ácido 5,6-epoxieicosatetranoico
5-LOX	Lipoxigenasa-5
8,9-EET	Ácido 8,9-epoxieicosatetranoico
8-LOX	Lipoxigenasa-8
AA	Ácido araquidónico
AAA	Aspartato de sodio ((6Z, 15Z)-20-hidroxieicosa-6,15-dienol)
ACE	Enzima de conversión de angiotensina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
ANOVA	análisis de varianzas
AR-V7	Variante del receptor de andrógenos presente en pacientes con cáncer de próstata
BSA	Seroalbúmina bovina
C4-2	Células derivadas de un tumor xenográfico de LNCaP
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas
CH-SFB	Suero fetal bovino charcoalizado

CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
CPa	Cáncer de próstata
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CSC	Células madre cancerígenas pluripotentes
c-Src	Proto-oncogen-protein-tirosin-quinasa
CTCs	Células tumorales en circulación
CTMs	Microembolias tumorales en circulación
CYP	Enzima perteneciente a la superfamilia del citocromo P450
CYP2	CYP pertenecientes a la familia 2 del citocromo P450
CYP4	CYP pertenecientes a la familia 4 del citocromo P450
CYP450	Citocromo P450
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
DBD	Domino de unión al ADN del receptor de andrógenos
DHT	5 α -dihidrotestosterona
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epitelial
EGTA	Ácido etilenglicoltetracético
EMPTY	Plásmido control vacío para luciferasa
ERK 1/2	Proteína reguladora de la señal extracelular 1/2
ETS	Factores de transcripción miembros de la familia E-veintiséis
FAK	Quinasa de adhesión focal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos

G0	Fase de quiescencia celular
G1	Fase intermedia 1 del ciclo celular
G2	Fase intermedia 2 del ciclo celular
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GIT-1	Quinasa de interactor-1 acoplada a receptores de proteína G
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GPR75	Receptor 75 acoplado a la proteína G (Gaq/11)
GRK	Quinasa del receptor acoplado a proteína G
HBP	Hiperplasia prostática benigna
HET0016	N-hidroxi-N'-(4-n-butil-2-metilfenil) Formamidina
HETEs	Ácidos hidroxiieicosatetranoicos
HIC-5	Proteína clon-5 inducible por peróxido de hidrogeno
HIF-1	Factor 1 inducible por hipoxia
HPETEs	Ácidos hidropoxieicosatetranoicos
HPR	Peroxidasa de rábano picante
HSP	Proteínas de shock termino
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
I κ B α	Inhibidor de NF-kB
IKK β	Quinasa de I κ B
INC	Instituto Nacional del Cáncer de Argentina
Kd	Constante de disociación
LB	Medio Luria-bertani
LBD	Domino de unión al ligando del receptor de andrógenos
LNCaP	Células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos
LOX	Lipoxigenasa
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina

MAPK	Proteínas quinasas activadoras de mitógenos
MDE	Medio privado de esteroides
MDS	Medio privado de suero
MMPs	Metaloproteasas de matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mTOR	Blanco de rapamicina en células de mamífero
NCI-NIH	Instituto Nacional del Cáncer de EEUU
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NLS	Domino de la secuencia de localización nuclear dependiente de ligando bipartito del receptor de andrógenos
NTD	Domino N-terminal del receptor de andrógeno
p38 MAPK	Proteína quinasa de mitógenos p-38
p53	Proteína supresora tumoral p53
PBS	Solución tampón de fosfato salino
PC-3	Células de cáncer de próstata no sensibles a andrógenos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDVF	Fluoruro de polivinilideno
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial de hidrógeno
PI3k/Akt	Vía de la quinasa B activada por fosfatidilinositol 3
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D

PSA	Antígeno prostático específico
PSA-Luc	Plásmido reportero de PSA acoplado de luciferasa
RA	Receptor de andrógenos
RAS/RAF	Vía de quinasas de aceleración rápida de fibrosarcomas
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RTKs	Receptores tirosina-quinasa
S	Fase de síntesis del ciclo celular
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	error estándar de la media
SFB	Suero fetal bovino
Slug	Factor de transcripción zinc-finger Snail2
SN	Medio condicionado
Snail1	Factor de transcripción zinc-finger Snail1
TBS	Solución tampón salina de tris
TBS-T	Solución tampón salina de tris con Tween 20 ®
TDA	Terapia de privación de andrógenos
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Twist-1	Proteína 1 relacionada con la torción de ADN
TXs	Tromboxanos
U-251	Línea celular de gliosarcoma humano U-251
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WHO	Organización mundial de la salud
WIT002	Ácido 20-hydroxyeicosa-6(Z),15(Z)-dienoico
ZEB	Homeosecuencia de zinc-finger de unión a la caja E

INTRODUCCIÓN

1. ÁCIDO 20-HIDROXIEICOSATETRANÓICO (20-HETE)

El ácido 20-Hidroxieicosatetranóico (20-HETE) es un metabolito del ácido araquidónico (AA) perteneciente a la familia de los eicosanoides (un grupo de moléculas de carácter lipídico originadas de la oxidación de los ácidos grasos esenciales de 20 carbonos) ¹.

El AA es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono con 4 dobles enlaces en las posiciones 5, 8, 11 y 14, en disposición *cis*, perteneciente a la familia de los ácidos grasos omega-6 (ω -6). **Figura 1.** Es un lípido estructural de la célula y comprende entre el 5 y el 15 % del total de los ácidos grasos que conforman los fosfolípidos de la membrana. Comúnmente, se encuentra ubicado en la posición 2 del esqueleto de glicerol de los fosfolípidos y está relacionado con la integridad estructural, fluidez y la flexibilidad de las membranas celulares ¹.

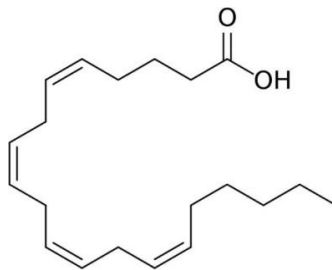


Figura 1. Estructura química del ácido araquidónico (AA)

Para los mamíferos, la fuente principal del AA es una dieta rica en aves de corral, pescado, mariscos y huevos ², además es posible su síntesis a partir de su precursor, el ácido linoléico, siguiendo la ruta de la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados ¹.

Es especialmente abundante en músculo esquelético, cerebro, hígado, bazo y retina. En el torrente sanguíneo, se encuentra una concentración muy baja de AA en su forma

libre (menos al 0.00312 $\mu\text{g/mL}$) debido a que la albumina presente en la sangre forma rápidamente enlaces con los ácidos grasos libres para protegerlos y transportarlos, pero se debe tener muy claro que la concentración de AA esterificado es 180 $\mu\text{g/mL}$ ³ siendo un ácido graso abundante en circulación ⁴.

Anteriormente se mencionó que el AA se localiza naturalmente en los fosfolípidos de membrana. Existen tres principales familias de fosfolipasas que pueden liberar el AA de los fosfolípidos: la fosfolipasa A2 (PLA2), la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa D (PLD), siendo la PLA2 la más importante.

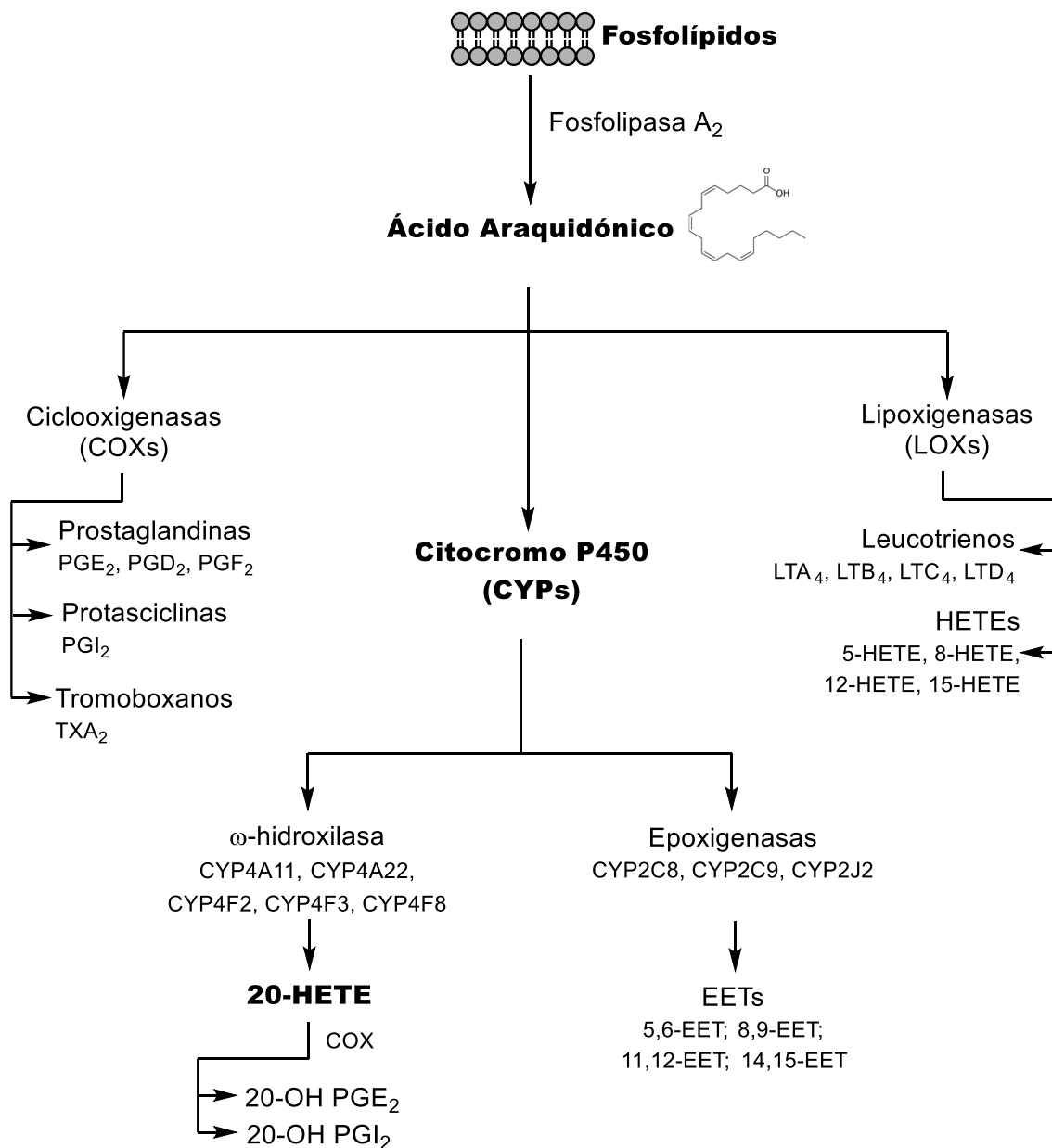


Figura 2. Vías metabólicas del ácido araquidónico. El AA es metabolizado por tres vías: ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y citocromo P450 (CYP). Para el 20-HETE se presenta la vía de degradación por acción de las COXs. Gráfico adaptado de *Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases*. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.12.002

El AA liberado puede ser metabolizado por tres posibles vías enzimáticas: ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y la vía del citocromo P450 (CYP450) para dar como resultado compuestos que actúan como moléculas de señalización y disparan señales moleculares autocrinas y paracrinas. Las vías metabólicas del AA se presentan en la **Figura 2**, y cada una de ellas se describe a continuación.

1.1. Vía de la ciclooxigenasa (COX)

Existen tres isoformas de la enzima COX, también conocidas como prostaglandina G/H sintetasa, que metabolizan al AA libre dando como producto los prostanoideos, término utilizado para englobar a las prostaglandinas (PGs) y los tromboxanos (TXs).

COX-1 es una enzima constitutiva expresada en todos los tejidos. COX-2, por otro lado, es una isoforma inducible encontrada en el riñón, en los macrófagos del cerebro y en los tejidos inflamados; que responde a estímulos inflamatorios como citoquinas, hormonas o factores de crecimiento. Finalmente, COX-3 es una isoforma expresada en el tejido nervioso y su función aún no se ha elucidado ⁵.

Las isoformas COX-1 y COX-2 introducen dos moléculas de O₂ al AA para formar 9,11-endoperoxido cíclico 15-hidroperoxido (PGG₂), producto inestable que rápidamente es hidratado pasando a PGH₂. La PGH₂ sirve como sustrato de varias enzimas específicas que generan las prostaglandinas PGE₂, PGD₂ y PGF₂, además de la prostaciclina PGI₂ y los tromboxanos (ej. TXA₂) ¹.

1.2. Vía de la lipoxigenasa (LOX)

A diferencia de la vía de las COX donde a partir de un sustrato común se producen las diferentes prostaglandinas y tromboxanos, en la vía de la LOX existe una enzima específica para cada posición de oxigenación del AA. La familia de las LOX, está constituida por cuatro isoformas nombradas de acuerdo al lugar donde actúan (5-LOX, 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX). Los productos de esta vía son los leucotrienos (LT), las lipoxinas (LX) y los ácidos hidroperoxieicosatetranoicos (HPETEs), que son rápidamente transformados en ácidos eicosatetranoicos (HETEs) por acción de las peroxidasas ¹.

1.3. Vía del Citocromo P450 (CYP)

La superfamilia del citocromo P450 (CYP) se encuentra formada por hemoproteínas monooxigenasas de función mixta presentes en plantas y animales, encargadas del metabolismo de diferentes sustratos, entre otros, los xenobióticos. En el genoma humano se encuentran codificados más de 50 miembros de este conjunto que surgieron de la duplicación de genes seguidos de divergencias posteriores que les dieron la capacidad de ser específicos para cada sustrato. La especificidad de estas enzimas se encuentra codificada en una delimitada región de la estructura primaria, y más importante aún, la especificidad por el sustrato de miembros cercanos de esta familia se encuentra definida por el cambio en residuos críticos o de un simple aminoácido en la estructura ⁶⁻⁸.

A fines de su nomenclatura, la abreviación CYP va seguida de un número que indica la familia del gen, seguida de una letra mayúscula que indica la subfamilia y otro número para el gen individual. Las familias de CYP comparten más del 40% de su identidad en aminoácidos, mientras que los miembros de las subfamilias comparten más del 55% de identidad en aminoácidos. Los CYPs son proteínas asociadas a las membranas citoplasmática, mitocondrial y del retículo endoplásmico, donde actúan metabolizando

diversos compuestos endógenos y exógenos⁶. Se expresan principalmente en el hígado donde participan en el metabolismo de xenobióticos.

Uno de los sustratos de los CYPs es el AA, el cual puede ser transformado en diferentes productos dependiendo de cuál de las isoformas del CYP actúe. Las epoxigenasas son CYPs pertenecientes a la familia CYP2, y a las subfamilias CYP2C y CYP2J, que introducen un grupo epoxi (-O-) a uno de los doble enlaces presentes en el AA, dando como resultado 4 productos regioisoméricos (ácidos epoxieicosatrienólicos, EETs) que dependiendo del lugar donde se produce la epoxidación pueden ser: 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; 14,15-EET⁹.

Por otro lado, los CYPs con actividad 20-hidroxilasa, conocidos también como ω -hidroxilasas, pertenecen a la familia CYP4, y a las subfamilias CYP4A y CYP4F. Introducen un grupo hidroxilo (-OH) en el carbono terminal o en determinados casos, cuando la disposición espacial del ácido graso ve comprometido el último carbono o bajo estímulos específicos, en el penúltimo carbono, dando como productos a los ácidos 20-hidroxi-eicosatetraenoico (20-HETE) y 19-hidroxi-eicosatetraenoico (19-HETE) en una proporción propia de cada enzima. Es importante aclarar que la cantidad de 19-HETE producida por las 20-hidroxilasas corresponde a una pequeña proporción del total de eicosanoide producido^{10,11}.

1.3.1. CYPs con actividad de epoxigenasas

En los seres humanos, la subfamilia de epoxigenasas CYP2C se encuentra conformada por 4 miembros (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19), mientras que la familia de CYP2J está constituida únicamente por 1 miembro, el CYP2J2. Todos los CYPs nombrados tienen la capacidad de producir EETs pero difieren en la actividad catalítica y la regio-estereoselectividad, además de la expresión en los diferentes tejidos.

1.3.2. CYPs con actividad de 20-hidroxiilasas.

Las 20-hidroxiilasas son un grupo de monooxigenasas, con una unidad HEMO en su estructura que transforman el grupo metilo terminal de una cadena hidrofóbica alifática en un metabolito alcohólico, más polar, a través de la catálisis de una reacción de oxidación. Conforman un grupo de 12 genes y 13 enzimas divididas en 6 subfamilias: CYP4A, CYP4B, CYP4F, CYP4V, CYP4X y CYP4Z ⁸; siendo los miembros pertenecientes a la subfamilia 4A y 4F las más estudiadas. Los CYP4A11 y CYP4F2 son las isoformas de mayor expresión en el humano ¹², siendo el CYP4F2 el de mayor actividad biológica ^{13,14,10}, motivo por el cual será objeto de nuestro estudio. Estas enzimas se expresan en diferentes tejidos y tipos celulares, pero se ha descrito la expresión más alta en el hígado y el riñón ¹⁵⁻¹⁸. La enzima CYP4F2 es la mayor productora de 20-HETE a nivel renal, responsable de la síntesis del 70 % del 20-HETE de origen renal ¹⁵.

Varios estudios demostraron que los andrógenos aumentan la expresión de varias isoformas del CYP4. Utilizando como modelo de estudio ratas y ratones, se encontró que la administración de 5 α -dihidrotestosterona (DHT) induce la expresión de CYP4 y aumenta la biosíntesis de 20-HETE ^{19,20-23}. Además, un trabajo de nuestro grupo confirmó que la incubación con DHT resulta en un aumento de la expresión del CYP4F2 en células de cáncer de próstata de origen humano sensibles a los andrógenos ²⁴.

1.3.3. 20-HETE. Origen, efectos y mecanismos de acción

La presencia de 20-HETE ha sido identificada en el hígado, riñón, corazón, pulmones, arterias, cerebro, intestino delgado y páncreas, siendo el músculo liso el principal sitio de síntesis de este eicosanoide ²⁵. Además, las células derivadas de la médula ósea como los neutrófilos, plaquetas y las células epiteliales progenitoras son consideradas fuentes de síntesis de 20-HETE ²⁶⁻²⁸.

Una vez sintetizado, el 20-HETE puede pasar a formar parte de los fosfolípidos de membrana ²⁹, activar quinasas de forma directa ³⁰, actuar como segundo mensajero intracelular ³¹, o interactuar con su receptor recientemente identificado, el receptor GPR75 ³². La inactivación del 20-HETE ocurre de manera espontánea por oxidación del hidroxilo del carbono terminal a grupo carboxilo dando como resultado el ácido 20-carboxieicosatetranóico (20-COOH-AA) ³³; o bien puede ser metabolizado por la COX-2 a 20-OH-PGE₂, un producto inactivo ³⁴ (Figura 2).

Las acciones mejor descritas del 20-HETE están relacionadas al sistema cardiovascular y renal. Este eicosanoide es un potente vasoconstrictor ³². Juega un complejo rol en la regulación de la presión arterial: mientras que a nivel renal incrementa la excreción de sodio, a nivel vascular aumenta la resistencia periférica ²⁹. Asimismo, juega un importante papel en la autorregulación del flujo sanguíneo en el cerebro ²⁵. Además, el 20-HETE tiene efectos pro inflamatorios, estimula la respuesta angiogénica y mitogénica, efectos que serán descritos más detalladamente en el apartado 2.4.

Las acciones como vasoconstrictor y natriurético del 20-HETE fueron atribuidas a la activación de la vía fosfolipasa C (PLC)/ proteína quinasa C (PKC); y sus efectos en la proliferación y migración celular han sido asociados con la activación del proto-oncogen protein-tirosin-quinasa (c-Src) y al receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR, por sus siglas en inglés) ³⁵. Estos mensajeros son comunes a otros estímulos que intervienen en la proliferación y transformación celular, y el crecimiento tumoral ^{35,28,36}.

1.3.3.1. *Receptor GPR75*

Uno de los misterios más grandes del 20-HETE, durante muchos años, fue el mecanismo de acción de este eicosanoide. Es sabido que el 20-HETE promueve la fosforilación del EGFR como primer paso para la activación de la cascada MAPK-IKKβ-

NF- κ B que termina en la producción de citoquinas inflamatorias ³⁷, y la expresión de la enzima de conversión de angiotensina (ACE, por sus siglas en inglés) ³⁸, entre otras.

Durante la última década, se debatió entre dos teorías que pudieran explicar las acciones de este eicosanoide: que el 20-HETE, al ser un ácido graso pequeño, pudiera traspasar la membrana plasmática y estimular la tirosina-quinasa y la consecuente fosforilación del EGFR, o que el 20-HETE actúe a través de un receptor acoplado a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) ³⁷, como ocurre con las prostaglandinas ³⁹.

Las primeras evidencias de un receptor específico para el 20-HETE surgieron en el año 2003 con el descubrimiento de que los análogos inactivos del 20-HETE antagonizaban la vasoconstricción inducida por este eicosanoide ⁴⁰.

Finalmente, en el año 2017, el receptor GPR75 acoplado a la proteína G ($G\alpha_{q/11}$), huérfano hasta ese momento, fue identificado en células del músculo liso como el receptor específico para 20-HETE. La constante de disociación (K_d) (constante referida a la solidez de las interacciones moleculares, a menor K_d , mayor afinidad de unión) está en el rango nanomolar (nM) ³², que representa una alta afinidad ligando-receptor. En los experimentos realizados en el trabajo publicado por Garcia *et al.*, se demostró que es necesario el estímulo del GPR75 para que el 20-HETE pueda fosforilar a EGFR a través de c-Src, e iniciar la activación de su cascada. Además se identificó que, acoplada a este receptor, se encuentra la proteína clon-5 inducible por peróxido de hidrogeno (HIC-5, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión focal expresada en las células de músculo liso de varios tejidos, y que por diferentes estímulos transloca al núcleo donde regula la expresión de varios genes ⁴¹. Finalmente se demostró que, ante el estímulo del agonista, el receptor GPR75 recluta mayor cantidad de la quinasa de interactor-1 acoplada a receptores de proteína G (GIT-1, por sus siglas en inglés) y aumenta la activación de PKC α . La **Figura 3**, ilustra las acciones desencadenadas por el estímulo del receptor GPR75 por el 20-HETE.

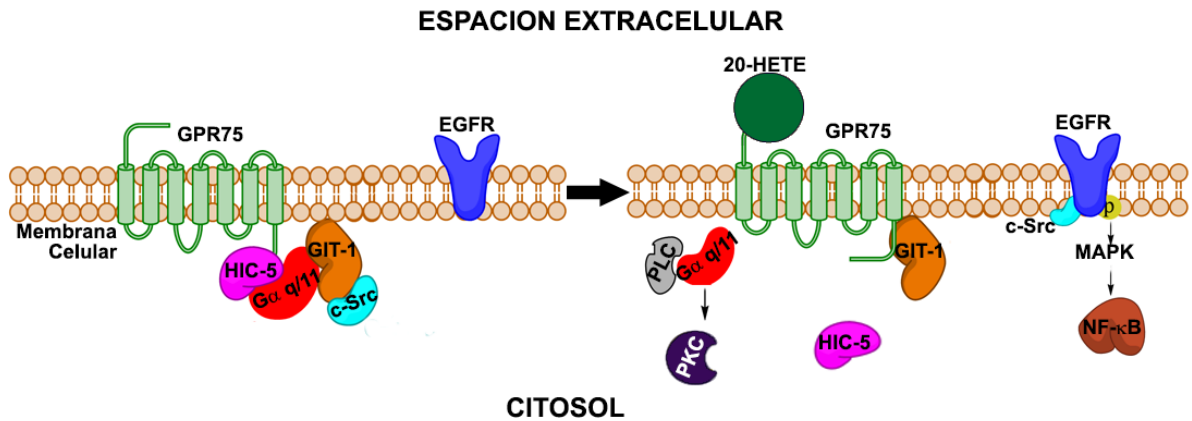


Figura 3. Receptor GPR75. Lado izquierdo: El receptor GPR75 en su forma inactiva. Lado derecho: Receptor GPR75 en presencia de 20-HETE; activación de la cascada de señalización desencadenada por el eicosanoide. Se observa la fosforilación de EGFR por acción de c-Src y la activación de PLC por la proteína $G\alpha_{q/11}$ y posterior activación de PKC. HIC-5: Clon-5 inducible por peróxido de hidrógeno, $G\alpha_{q/11}$: Subunidad de proteína G que activa a la fosfolipasa C (PLC), GIT-1: Quinasa de interactor 1 acoplada a receptores de proteína G, c-Src: Protooncogeno tirosina quinasa Src, EGFR: Receptor del factor de crecimiento epitelial, MAPK: Proteína-quinasa activada por mitógenos, PKC: Proteína quinasa C, NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Gráfico adaptado de *20-HETE Signals Through G Protein-Coupled Receptor GPR75 (Gq) to Affect Vascular Function and Trigger Hypertension*. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310525.

El silenciamiento de la expresión de GPR75 en ratones modificados genéticamente para la sobreexpresión de la isoforma CYP4A12, y la consecuente mayor producción endógena de 20-HETE, evitó las respuestas fisiopatológicas del 20-HETE: elevación de la presión arterial, incremento de la expresión de ACE, disfunción endotelial, contractilidad del músculo liso y remodelación vascular ³².

La identificación de este receptor permitió diagramar los posibles caminos a través de los cuales actúa el 20-HETE. Además, constituyó la primera evidencia de que el producto de las 20-hidroxilasas actúa a través de un receptor tipo GPCR ¹¹.

El receptor GPR75 se expresa en las células que rodean las arteriolas de la retina y se encuentra en diferentes áreas del cerebro ⁴². Además, las bases de datos disponibles muestran que este receptor se expresa en la mayoría de los tejidos humanos incluyendo el cerebro, el riñón, la próstata y el corazón ⁴³.

2. CÁNCER

2.1. Definición

El cáncer es un grupo de patologías que tienen en común un crecimiento celular anormal y, en muchos casos, la adquisición de la capacidad de diseminarse y formar nuevos focos de crecimiento. En los seres humanos es un proceso que involucra gran cantidad de pasos que terminan en la transformación de un tejido normal a uno altamente maligno. Cada uno de estos pasos es un reflejo de las alteraciones genéticas y epigenéticas acumuladas por las células ⁴⁴. Si bien las razones por las cuales se producen estas alteraciones, y el orden en el cual se producen, aún son evasivas para la ciencia, innumerables estudios y esfuerzos han permitido identificar algunas características indispensables para el desarrollo tumoral.

Por lo general, estas células naturalmente transformadas tienen la capacidad de mantener activas las señales de proliferación, evadir los estímulos supresores de crecimiento y activar la invasión y la metástasis. Presentan inmortalidad replicativa, tienen una alta tasa de inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte celular. Además, presentan una desregulación en el metabolismo energético y son capaces de evadir la destrucción por el sistema inmune utilizando a este último como un medio para el beneficio tumoral y la promoción de la inflamación. El genoma de estas células se caracteriza por la gran inestabilidad y mutabilidad. No todas estas características se encuentran presentes en cada célula tumoral, ni en todos los estadios de la enfermedad, pero se ha identificado que cada una de ellas es indispensable para el desarrollo y progresión de la enfermedad ^{45,46}.

Por otro lado, cada uno de los componentes que conforman el microambiente tumoral (células tumorales maduras e inmaduras, células inmunes asociadas a la inflamación, pericitos, células endoteliales, fibroblastos, entre otros), así como la disponibilidad o falta de nutrientes y señales celulares dentro del tumor, juegan un rol fundamental en el

desarrollo y malignidad de la enfermedad ⁴⁵. En la **Figura 4** se presenta un resumen gráfico de las transformaciones necesarias para la progresión tumoral.



Figura 4. Transformaciones generales de la progresión tumoral. Se presenta las características fundamentales identificadas para el desarrollo tumoral y la progresión de la enfermedad. En la parte central del gráfico se observan los componentes del microambiente tumoral. Gráfico adaptado de *Hallmarks of cancer: the next generation*. Doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

2.2. Ciclo celular

El ciclo celular es una serie de eventos en los cuales los componentes celulares son duplicados de manera controlada con el fin último de dividirse y dar como resultado dos células hijas funcionales y con características y morfología iguales. Este ciclo se presenta con una naturaleza oscilatoria y fluctúa entre la fase de síntesis (fase S) y la de mitosis (fase M), separadas entre sí por dos fases intermedias conocidas como fase G1 y G2. Para ciertas células maduras, la fase de quiescencia celular o fase G0 se puede considerar como la detención del ciclo celular ⁴⁷. La decisión de pasar de G1 a S representa un punto de no retorno que obliga a la célula a terminar en la división de dos células iguales, siendo un pasaje totalmente controlado y normalmente llamado “punto de restricción” ⁴⁸.

Los complejos proteicos que median el pasaje entre fase y fase del ciclo celular son heterodímeros con actividad de serina/treonina quinasa y se componen por las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, por sus siglas en inglés) que tienen una función catalítica y, por otro lado, las ciclinas que tienen una función regulatoria, debido a que su concentración oscila a medida que progresa el ciclo celular ⁴⁹. Por lo tanto, es característica la presencia de ciertas familias específicas de ciclinas-CDKs en cada una de las fases del ciclo. La **figura 5** ilustra la progresión del ciclo celular y la dinámica de la expresión de ciclinas y CDKs.

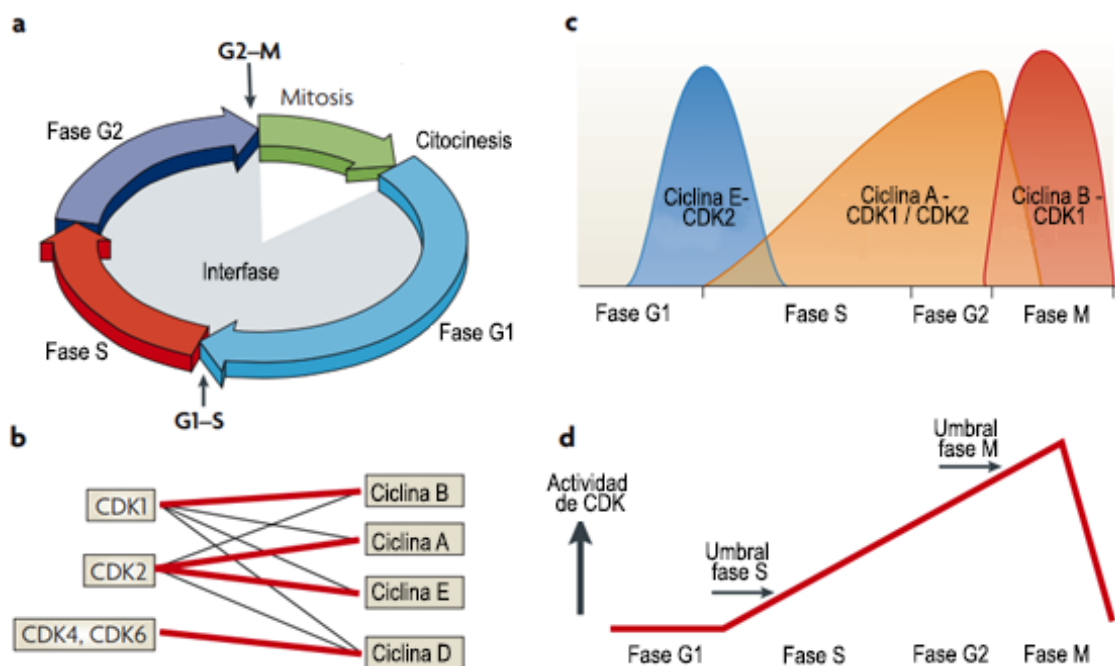


Figura 5. Fases del ciclo celular y dinámica de expresión de ciclinas. **A.** Fases del ciclo celular con la representación de los puntos de control del ciclo celular entre fase y fase. **B.** CDKs y ciclinas combinables. Las líneas rojas representan las uniones más comunes y documentadas, las líneas negras corresponden a uniones descritas encontradas en menor proporción en diferentes tipos celulares. **C.** Dinámica de expresión y predominio de las ciclinas por fase. **D.** Actividad de las CDK de acuerdo con la progresión del ciclo celular, el límite de cada fase se muestra con flechas. CDK: Quinasas dependientes de ciclinas. Adaptado de *Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?* Doi: 10.1038/nrm2510.

La correcta progresión entre las fases del ciclo celular, asegurando la integridad de cada uno de los componentes celulares que deben ser duplicados y conservados, quedan asegurados en los puntos de control o “checkpoints”. Uno de los principales puntos de

control del ciclo celular es la integridad del ADN y se controla por dos mecanismos: aquellos controlados por la proteína supresora tumoral p53 en la fase G1 ⁵⁰, o, aquellos controlados por el camino de la quinasa de punto de control 1 (Chk1, por sus siglas en inglés) que es muy eficiente en la detención del ciclo celular en la fase S y G2 ⁵¹. En el caso de que la reparación no sea exitosa la célula puede quedar atrapada en senescencia o entrar en apoptosis ⁵². El segundo punto de control importante sucede durante la anafase en la alineación de las cromátides hermanas en el huso mitótico. Se verifica en este punto el correcto ensamblaje del huso mitótico con los cromosomas y la actividad de las CDKs para las degradaciones finales necesarias para la telofase.

Una de las características principales presentes en las células tumorales es la desregulación del ciclo celular, que juntamente con la activación constitutiva de señales mitogénicas o, en algunos casos, la falta de estas señales, promueven una sobreproliferación descontrolada ⁵³, en la cual los puntos de control son sobrepasados dando como resultado la inestabilidad genética y la acumulación de mutaciones que derivan en un fenotipo celular más agresivo y metastásico.

2.3. Desarrollo de metástasis

La capacidad de diseminarse a otros órganos define la malignidad del tumor y aproximadamente el 90% de los casos de muerte por cáncer no están relacionados al tumor primario, el cual suele ser quirúrgicamente extraíble y tratable, sino al desarrollo de metástasis. Este proceso es biológicamente ineficiente debido a todas las barreras que deben atravesar las células y a las transformaciones y adaptaciones que deben sufrir las mismas ⁵⁴.

Diferentes modelos animales desarrollados a partir de líneas celulares con características altamente agresivas y metastásicas han demostrado que únicamente el 0.01% de las células pueden sobrevivir en el torrente sanguíneo, y aun así eso no

asegura que formen una metástasis o entren en un estado de latencia esperando las condiciones adecuadas para el desarrollo tumoral ⁵⁵.

Existen dos corrientes de pensamiento sobre el desarrollo de metástasis para tumores sólidos: el primero es un modelo lineal en el cual se remarcan cinco fases con sus características propias que terminan en la formación de un tumor secundario. En este modelo, se considera que el proceso de formación de una metástasis empieza una vez que se establece un tumor maduro y plenamente constituido ⁵⁶.

Contrariamente, en los últimos años ha surgido una nueva teoría que explica que la cascada que se desencadena para el desarrollo de una metástasis empieza muy temprano en la formación del tumor, aun antes de ser clínicamente diagnosticado. Este modelo refiere a un desarrollo mucho más complejo que el modelo lineal, y sugiere múltiples procesos que ocurren de manera paralela ⁵⁷.

Aun en este último modelo, para que las células puedan desarrollar exitosamente una metástasis deben desligarse del tumor primario, invadir el tejido circundante, penetrar en los vasos linfáticos o sanguíneos, sobrevivir en circulación, inmovilizarse en vasos distantes, extravasar para entrar a un nuevo potencial e inhóspito microambiente donde habrán de sobrevivir, adaptarse a las condiciones locales y formar una colonia ⁵⁴. Una de las herramientas comúnmente utilizada por las células tumorales para adquirir las características necesarias para sobrevivir a cada uno de los pasos necesarios para la formación de metástasis es el cambio de fenotipo, de epitelial a mesenquimal, conocido como transición epitelio mesenquimal (TEM). La **Figura 6** ilustra el proceso de metástasis a partir de un tumor epitelial.

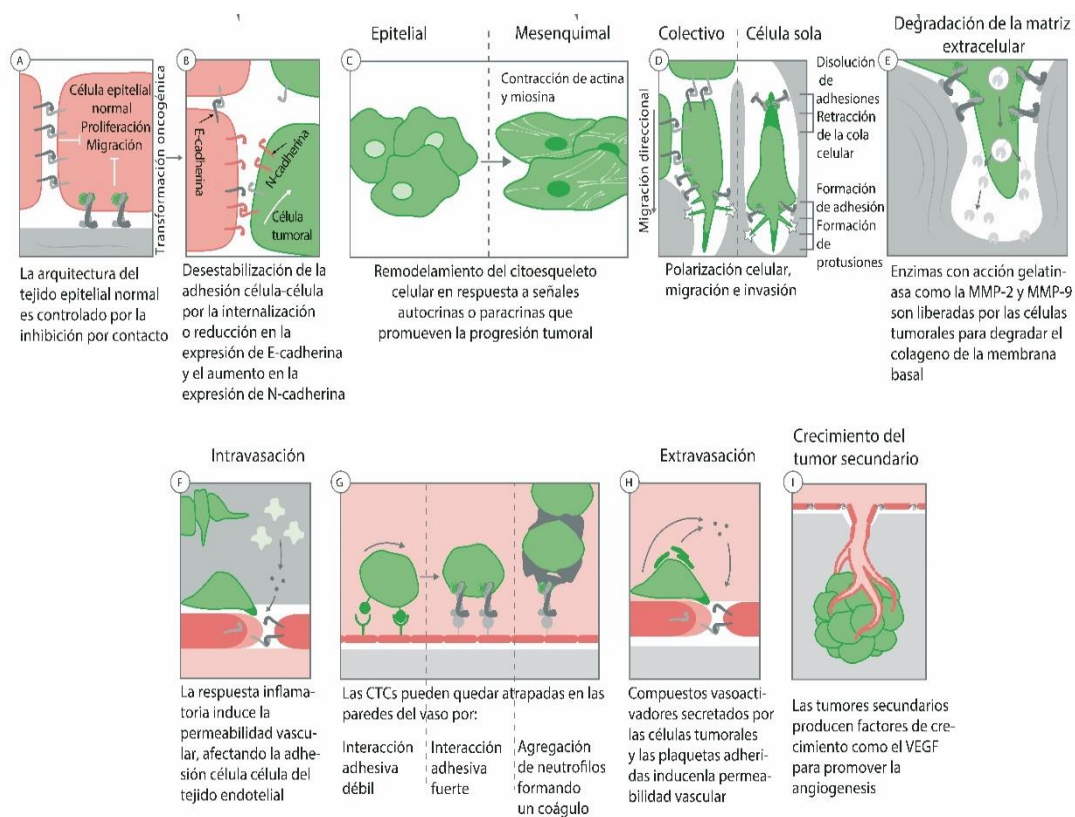
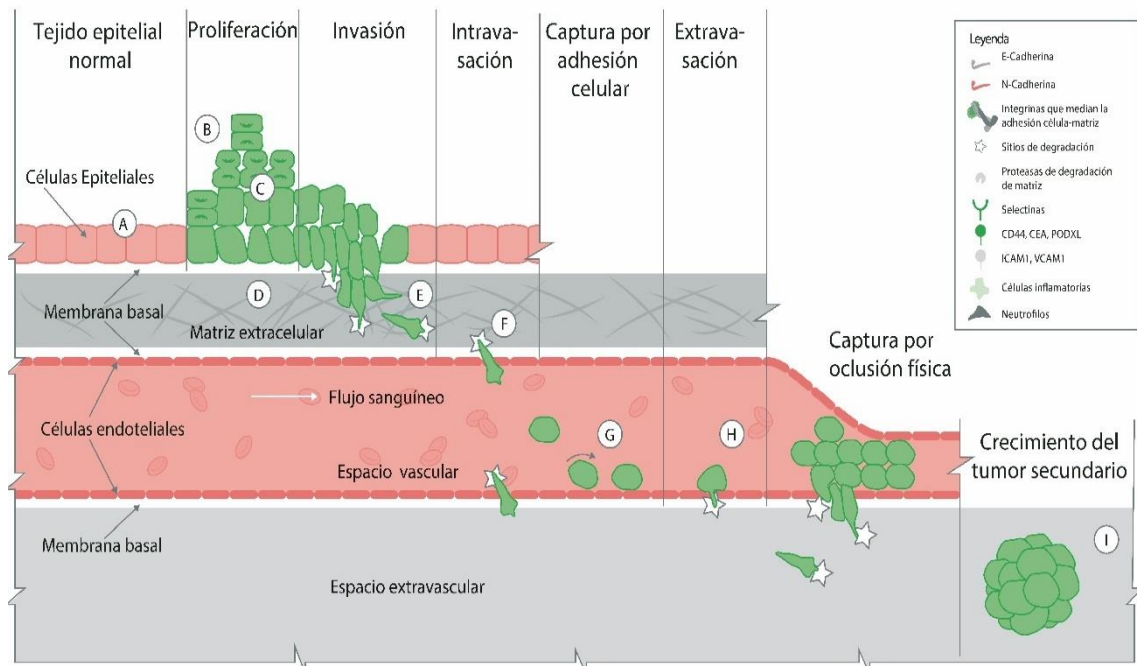


Figura 6. Desarrollo de metástasis en tumores epiteliales. **A.** Células epiteliales. **B.** Sobreproliferación celular y pérdida de uniones célula-célula. **C.** Transición epitelio-mesenquimal. **D.** Migración celular, remarcando la formación de adhesiones focales. **E.** Células invadiendo tejidos circundantes con activación de promotores de la degradación de la matriz extracelular. **F.** Intravasación. **G.** Supervivencia en el torrente sanguíneo y arresto de la célula por acción de proteínas de anclaje. **H.** Extravasación. **I.** Crecimiento del tumor secundario. Imagen adaptada de boletín de Abcam, *Cell adhesion and metástasis*, poster, 2017.

2.3.1. Disociación celular del tumor primario

Los tumores sólidos son enormemente heterogéneos, formados por células epiteliales provenientes de la evolución policlonal que promueve la proliferación y supervivencia, por células con características de células madre que presentan pluripotencialidad (CSC por sus siglas en inglés), por células del propio sistema inmune que son reclutadas, y por las células que conforman el microambiente tumoral ⁵⁸.

Las células epiteliales normales no tienen la capacidad de invadir la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés), en cambio, para una célula cancerosa, ésta es una característica necesaria para su evolución. Una de las teorías que explica la capacidad de la célula de disociarse del tumor primario e invadir el tejido circundante refiere a un mecanismo propio de células embrionarias: la TEM. Durante este proceso las células cambian de fenotipo, perdiendo la polaridad ápico-basal del citoesqueleto y los complejos de adhesión célula-célula (evidenciado por la pérdida de la expresión de e-caderina y de las ocludinas). Adquieren además la capacidad invasiva y migratoria de las células mesenquimales, caracterizada por la expresión de marcadores propios de este fenotipo (n-caderina, vimentina, fibronectina) ⁵⁹. El cambio en la expresión de caderinas se conoce como “switch de caderinas” y es reconocido por proveer a la célula con una mayor capacidad migratoria, al tiempo que previene la apoptosis y la senescencia. Se ha descrito que el factor de crecimiento transformante β (del inglés, TGF- β) y la hipoxia son señales que activan la expresión de factores que regulan la transformación en células tumorales, como Snail1 ⁶⁰, Slug ^{60,61}, ZEB1 ⁶²⁻⁶⁴, ZEB2 ^{63,65} y Twist ⁶⁶, los cuales a su vez han sido asociados a la activación de TEM que resulta en el desarrollo del proceso metastásico.

2.3.2. Invasión celular

Los tumores sólidos se encuentran embebidos en una compleja matriz extracelular formada por una variada cantidad de componentes que se pueden clasificar en tres

grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina), además de barreras físicas como la membrana basal y el endotelio de los vasos sanguíneos y linfáticos ⁶⁷.

Es necesario para las células tumorales que iniciaron migración, solas o en conjunto, tener la capacidad de reconfigurar la matriz extracelular, desintegrando los anclajes que las mantienen juntas y pegadas. Esto depende de la capacidad de invasión de la célula misma y de la conformación de la matriz extracelular del tumor primario.

Las metaloproteasas de matriz (MMPs, por sus siglas en inglés) son proteínas que se encuentran finamente controladas en los tejidos normales, y son una de las principales señales sobreactivadas en tejidos tumorales. Forman parte del grupo de enzimas encargadas de la degradación y reconfiguración de la matriz extracelular. Las MMPs conforman un grupo de veintiseis endopeptidasas dependientes de zinc que se encuentran ancladas a la membrana celular y se subdividen en cinco familias dependiendo de su función y estructura: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, metaloproteasas de membrana y otras MMPs ⁶⁸.

Las células pueden migrar solas o en conjunto, en este último caso, al frente del conglomerado pueden encontrarse células con características mesenquimales que tienen adheridas un cúmulo de células que mantienen las características epiteliales ⁶⁹. Sea cual fuere el caso, desde el punto de vista molecular deben activarse varias vías intracelulares identificadas en la migración celular, como la vía del fosfatidilinositol trifosfato (PIP3, por sus siglas en inglés). Cuando se estimula PIP3, activa las enzimas con acción GTPasa pertenecientes a la familia Rho, que modulan a su vez la reestructuración del citoesqueleto celular, la adhesión celular a través de la activación de las quinasas de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) y el tráfico de membranas, siendo cada uno de estos eventos necesarios para la motilidad celular ⁷⁰.

2.3.3. Intravasación

El pasaje de las células tumorales al torrente sanguíneo es uno de los puntos importantes en la formación de las metástasis, pues permite la diseminación celular a órganos distantes donde puede iniciarse el tumor secundario. Varios factores contribuyen a la intravasación: el fenotipo del tumor primario, la integridad del endotelio y el microambiente local ⁵⁶. El ingreso al torrente sanguíneo involucra drásticos cambios en la forma y unión de las células tumorales, que adquieren el nombre de células tumorales en circulación (CTCs, por sus siglas en inglés) cuando se encuentran hasta tres células juntas, o microembolias tumorales en circulación (CTMs, por sus siglas en inglés) cuando son conjuntos grandes de células ⁵⁷. Tanto las CTCs como las CTMs deben superar la muerte celular, al sistema inmune y a la desfragmentación por el flujo sanguíneo cuando se encuentran en circulación ⁷¹. Además, las CTCs deben adquirir la capacidad de resistir al *anoikis*, tipo de apoptosis desencadenado por una insuficiente interacción de la célula con la matriz extracelular y otras células ⁷².

2.3.4. Extravasación

La extravasación y la colonización son procesos conjuntos que se producen en tres pasos consecutivos: el arresto de la CTC en los vasos sanguíneos, la migración a través del endotelio y la supervivencia, proliferación y colonización del lugar de siembra de las células tumorales ⁵⁷.

El primer paso en la extravasación es el arresto en los vasos sanguíneos que puede ocurrir por oclusión o adhesión de las CTCs al endotelio vascular ⁷³. Las oclusiones pueden formarse a partir de trombos asociados a tumores, la trombina facilita la adhesión de las CTCs al endotelio, dándole a las células ventajas para extravasar antes de que el trombo sea liberado ^{74,75}. Tanto la adhesión como las oclusiones suelen ocurrir donde el flujo sanguíneo es bajo ⁷⁶.

Una vez adheridas al endotelio, las CTCs pueden ingresar al espacio perivascular a través de una migración transendotelial o a través de la disrupción del endotelio ⁵⁷. El tumor primario envía señales moleculares a través del sistema vascular que promueve en diferentes capilares la expresión de citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento, como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), provocando una disminución de la formación de la barrera endotelial, que permite la salida de las CTCs y el inicio de la angiogénesis cuando el tumor secundario se encuentra formado ⁷⁷. En experimentos *in vivo*, menos del 0.01% de las células inyectadas al torrente sanguíneo lograron sobrevivir y extravasar.

Una vez atravesado el endotelio, la célula tumoral debe adaptarse al nuevo microambiente en el cual se encuentra. Aquellas con capacidades adaptativas desarrolladas y un ambiente favorable proliferan rápidamente y el tumor secundario se desarrolla. En otros casos, si las células no pueden adaptarse rápidamente, o cuando el nicho tiene una alta producción de señales anti proliferativas las micrometastasis entran en latencia. En este estado las células pueden estar quiescentes, con activación de señales intracelulares que las retienen en la fase G0 del ciclo celular, como la activación de la quinasa p-38, o pueden encontrarse en un equilibrio entre proliferación y muerte celular que no permite que el tumor aumente de tamaño ⁷⁸. Estas células o micrometastasis pueden volverse activas entre días o décadas.

2.4. Expresión de 20-hidroxisas en tumores

En cáncer, las isoformas del CYP asociadas típicamente con la eliminación de drogas se encuentran disminuidas, al tiempo que aumentan las isoformas de la familia CYP4 con actividad de 20-hidroxisas que utilizan sustratos endógenos ⁸.

Estudios *in vitro* demostraron que la expresión del mRNA del CYP4F2 es mayor en células de adenocarcinoma renal respecto de sus controles normales ⁷⁹. Mas aún, en tumores de tiroides, ovario, mama y colon de origen humano existe una sobreexpresión

del mRNA y proteínas de las isoformas CYP4F2 y CYP4A11 ⁸⁰. Asimismo, la expresión del CYP4F2 y CYP4F3 es mayor en el adenocarcinoma ductal pancreático en comparación con los tejidos adyacentes emparejados ⁸¹.

Otros autores han encontrado una correlación negativa entre la intensidad de expresión del CYP4A11 (la otra 20-hidroxilasa expresada en humanos) y el pronóstico de la enfermedad en una cohorte de 650 pacientes con cáncer de colon. Más específicamente, el promedio de supervivencia fue de 132 meses para los portadores de tumores con expresión negativa para CYP4A11 y de 105 meses para los positivos ³⁹. En otro trabajo, con una cohorte de 98 pacientes, se encontró una mayor intensidad de expresión del CYP4A11 en muestras de carcinoma de mama invasivo respecto del no invasivo o de tumores benignos ⁸².

Sin embargo, para la interpretación objetiva del conjunto de estos hallazgos, debe considerarse que todas las enzimas responsables de la fase I del metabolismo de xenobióticos, entre las cuales las de la familia del citocromo P450 son las más abundantes, transforman sustancias pro-carcinógenas en carcinógenos con potencial capacidad de unirse al ADN. Tal unión podría dañar su estructura originando formas mutadas de genes normales, cuya función alterada (producción aumentada, disminuida, anormal o nula de las proteínas que codifican) estimularía la proliferación o invasión celular ⁸³. De esta forma, no podemos descartar que otros mecanismos independientes del 20-HETE contribuyan al fenotipo maligno que se asocia a la expresión del CYP4F2.

2.4.1. Efectos protumorigénicos del 20-HETE

Existen evidencias que sostienen el impacto del 20-HETE en aspectos relevantes de la biología tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Este eicosanoide puede originarse en las células tumorales o bien en las células endoteliales y/o del estroma, contribuyendo así a la formación del microambiente tumoral ^{84,85}.

En una variedad de modelos tumorales se ha descrito la participación del 20-HETE en los procesos que determinan el desarrollo del tumor primario y de las metástasis que incluyen, entre otros, la proliferación celular ^{86,87,79}, la inhibición de la apoptosis ^{79,88}, la capacidad metastatizante ⁸⁸, y la angiogénesis ^{89,90}. Así por ejemplo, en modelos animales de gliosarcoma ⁹¹, cáncer de pulmón ⁹² y de mama ⁹³ se demostró que la inhibición de la síntesis del 20-HETE redujo el crecimiento tumoral, mientras que la sobre expresión de la 20-hidroxilasa resultó en un fenotipo tumoral hiperproliferativo y más invasivo ³⁶. En la **Figura 7** se muestra el aporte del 20-HETE a la activación de diferentes cascadas de señalización que resultan en la progresión tumoral.

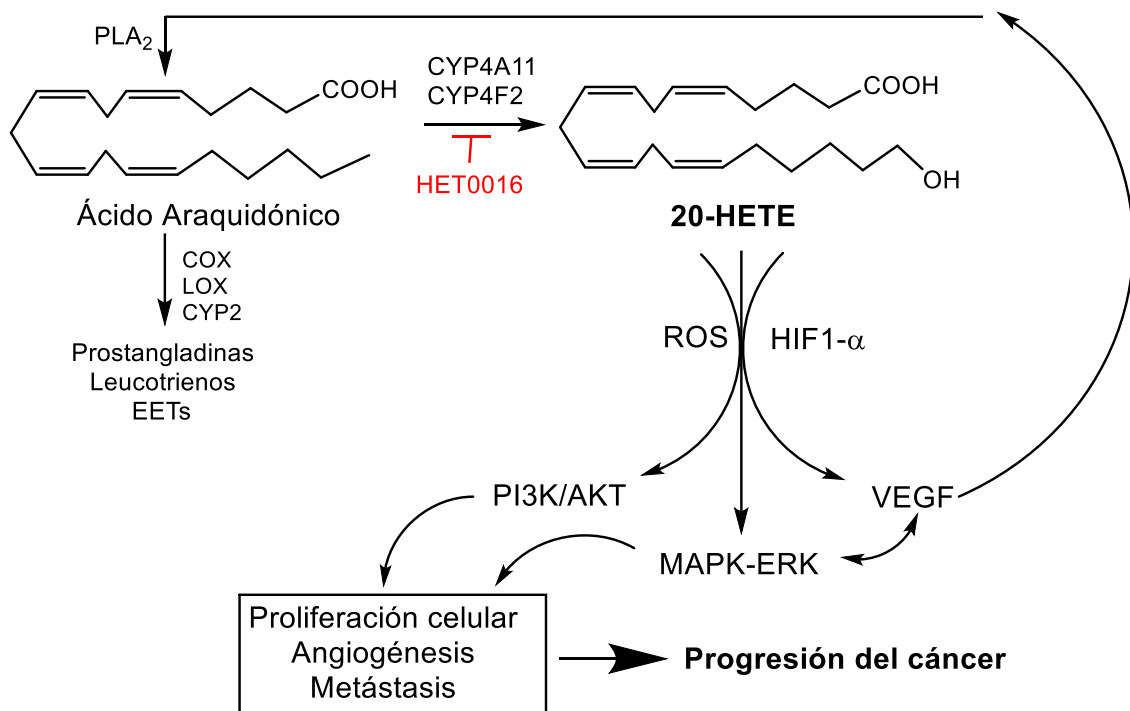


Figura 7. Efectos protumorogénicos del 20-HETE. El ácido araquidónico libre puede ser metabolizado por diferentes caminos enzimáticos, pero las isoformas del citocromo 450 con acción 20-hidroxilasa (CYP4) transforman al ácido araquidónico a 20-HETE, el cual activa al HIF1- α , que desencadena la actividad de VEGF para interactuar con la vía de las MAPK y, además, activar PLA₂. Por sí solo, el 20-HETE es capaz de activar la cascada de señalización del MAPK-ERK y, a través de ROS, activa la vía PI3K/AKT, que conjuntamente promueven la progresión del tumor a través de la activación de diferentes mecanismos. En color rojo se presenta a N-hidroxi-N'-(4-n-butil-2-metilfenil) Formamidina (HET0016), un inhibidor de la síntesis de 20-HETE, que inhibe la actividad de CYP4. PLA₂: Fosfolipasa A2, COX: Ciclooxygenasas, LOX: Lipoxigenasas, CYP2: Citocromo P450 subfamilia 2, ROS: Especies reactivas del oxígeno, HIF1- α : Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, MAPK-ERK: Vía de las quinasas activadas por mitógenos,

2.4.1.1. Impacto sobre la proliferación

El 20-HETE ha sido implicado en la proliferación celular a través de la activación de factores de crecimiento como el VEGF, el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) ⁹⁴.

La primera asociación entre la biodisponibilidad de 20-HETE con el aumento en la proliferación en células cancerígenas se observó en la línea de gliosarcoma humano U-251, en la cual se demostró que el HET0016, un inhibidor de la síntesis de 20-HETE, tuvo un efecto antiproliferativo. Más aun, la sobreexpresión de la enzima CYP4A1 (variante de 20-hidroxilasa de rata) en las mismas células resultó en un fenotipo celular hiperproliferativo e invasivo ³⁶.

Asimismo, el HET0016 disminuyó la proliferación de la línea celular de glioma humano 9L ⁸⁶, de carcinoma renal de células claras 786-O y 769-P ⁷⁹, y de cáncer de mama MDA-MB 231 ⁹³, tanto *in vivo* como *in vitro*.

2.4.1.2. Impacto sobre la metástasis

En los últimos años se ha demostrado que el 20-HETE promueve la capacidad invasiva, migratoria y metastásica en diferentes modelos celulares tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, en la línea celular de células pequeñas de cáncer de pulmón se observó que la sobreexpresión de CYP4A11 (mayor actividad sobre la síntesis de 20-HETE) promovió un fenotipo más agresivo a través del aumento de la expresión de VEGF y de metaloproteasa-9 (MMP-9), asociado a su vez a la vía PI3K/AKT y ERK 1/2 ⁹². Además, como se ha mencionado en el punto anterior, la sobreexpresión de CYP4A1 en las células U-251 resultó en un fenotipo celular más invasivo ³⁶.

2.4.1.3. Impacto sobre la angiogénesis

El 20-HETE aumenta el potencial angiogénico en una variedad de tumores. Así, por ejemplo, en un modelo de cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), la activación de la vía del 20-HETE aumentó la expresión de VEGF y MMP-9, mientras que el antagonista WIT002 o el inhibidor HET0016 redujeron su expresión en las muestras del tumor y disminuyeron la vascularización tumoral ⁹². Asimismo, en tumores generados por células de cáncer de mama, la sobreexpresión del CYP4Z1 correlacionó con el incremento de la expresión de VEGF y una mayor angiogénesis, mientras que la inhibición de la síntesis de 20-HETE redujo el tamaño y la angiogénesis tumoral ⁹⁵.

Además, nuestro grupo de investigación reportó recientemente que en un modelo tumoral murino de feocromocitoma, el tratamiento con 1-ABT (inhibidor de los CYPs que metabolizan el AA) disminuyó significativamente la actividad de las variantes 20-hidroxilasas del CYP, lo que resultó en una menor vascularización tumoral ⁹⁶.

3. CÁNCER DE PRÓSTATA

3.1. Función e histología de la próstata normal

La próstata es un órgano fibromuscular y glandular en forma de nuez, que pertenece al aparato reproductor masculino y se encuentra ubicado en la base de la vejiga rodeando el tercio superior de la uretra. La secreción prostática forma parte del semen, juntamente con los fluidos provenientes de las glándulas seminales y el esperma de los testículos. Histológicamente, la próstata está constituida por unidades glandulares, cuyo epitelio secretor está conformado por células epiteliales secretoras y células basales. Las células secretoras se encuentran en mayor número y son sensibles a los andrógenos, son las encargadas de la producción de dos proteínas específicas: la fosfatasa ácida prostática y el antígeno prostático específico (PSA). Los niveles en suero de PSA son utilizados con fines diagnósticos de desórdenes prostáticos.

Dispersas en la glándula prostática se encuentran también células neuroendocrinas, que cumplen la función de señalización paracrina. La envoltura que recubre a la próstata se encuentra conformada por fibroblastos, fibras del músculo liso, vasos linfáticos y terminaciones nerviosas; la conformación de esta capa puede influenciar en el desarrollo del cáncer de próstata (CPa) ⁹⁷.

Anatómicamente, la próstata se puede dividir en cuatro regiones: la zona periférica, la central, de transición y el estroma fibromuscular anterior. Entre el 60 y el 75% de los carcinomas se inician en la zona periférica, mientras que la zona del estroma fibromuscular es el lugar donde normalmente se desarrollan las hiperplasias prostáticas benignas (HPB) ⁹⁸.

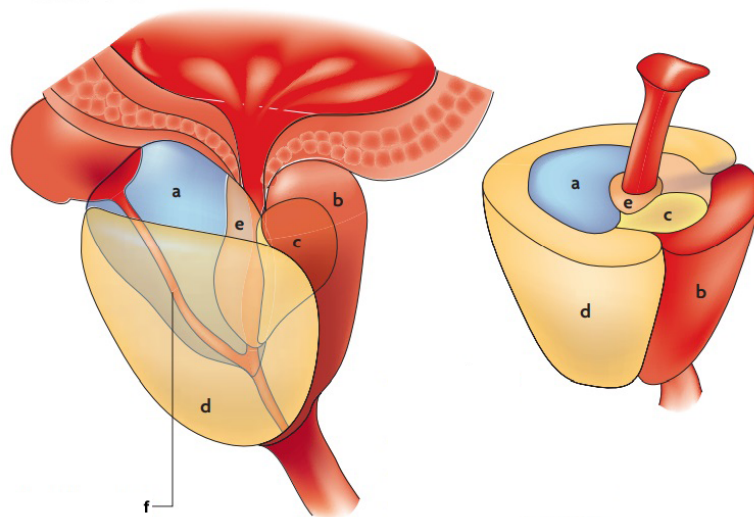


Figura 8. Anatomía prostática. Se presentan las zonas que conforman la próstata. **A.** Zona central. **B.** Zona fibromuscular. **C.** Zona de transición. **D.** Zona periférica. **E.** Región periuretral. **F.** Conductos eyaculatorios. Gráfico adaptado de *Inflammation in prostate carcinogenesis* Doi: 10.1038/nrc2090

Del total de casos de CPa, el 95% de los casos son adenocarcinomas que tienen como origen las células epiteliales secretoras. Otros tipos histológicos de carcinomas que se pueden desarrollar en la glándula prostática son: carcinomas de células pequeñas no diferenciadas, tumores neuroendócrinos, carcinomas mucinosos, carcinomas císticos y sarcomas.

La transformación maligna de la próstata se desarrolla en varias etapas, iniciando por la neoplasia prostática intraepitelial, seguido por el cáncer de próstata localizado y puede progresar al adenocarcinoma avanzado con invasión local y, en gran cantidad de casos, metástasis. La gradación de Gleason es la escala utilizada para clasificar la agresividad de los adenocarcinomas prostáticos según sus características histológicas ⁹⁹.

3.2. Datos epidemiológicos del Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata es el segundo carcinoma con mayor cantidad de casos a nivel mundial, con un aproximado de 1,2 millones de nuevos casos y 360.000 muertes para el año 2018 ¹⁰⁰, último dato disponible por la Organización Mundial de la Salud (WHO). Según datos del Nacional Cancer Institute de EEUU (NCI-NIH) el 99% de los casos son detectados en hombres mayores de 45 años, con una edad media de 66 años ¹⁰¹. Estudios epidemiológicos han establecido que los antecedentes familiares de cáncer de próstata aumentan significativamente el riesgo de desarrollo de este tipo de carcinoma, además de que se considera como factor de riesgo la ascendencia afroamericana, la menor frecuencia de eyaculación y la disposición genética al desarrollo de ciertos tipos de cáncer ⁹⁹. Algunos estudios asocian la ingesta excesiva de grasas como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad y la obesidad como un catalizador para la agresividad de la misma ¹⁰².

Según las últimas estadísticas publicadas por el Instituto Nacional del Cáncer (INC, correspondientes al año 2018), en nuestro país el cáncer de próstata es el carcinoma con mayor incidencia en la población masculina, con una ocurrencia de 11000 casos anuales ¹⁰³, habiendo ocasionado 3771 muertes en el año 2017. Esta cifra lo posiciona como la tercera causa de muerte por cáncer a nivel nacional en hombres y la quinta causa en la población en general ¹⁰⁴. En los últimos 10 años la mortalidad por esta enfermedad ha disminuido significativamente debido al desarrollo de mejores terapias y

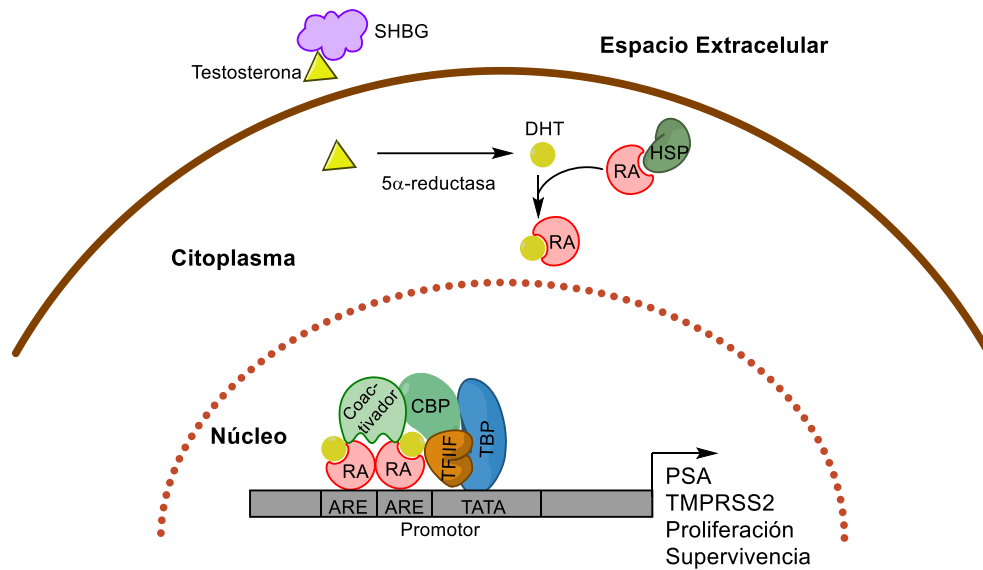
a la detección temprana de las neoplasias, como consecuencia de la concientización de la población masculina y a la mejor interpretación de los niveles del PSA en sangre ¹⁰⁵.

El cáncer de próstata suele ser asintomático en sus estadíos tempranos, siendo los principales síntomas del desarrollo de esta enfermedad la dificultad para orinar, el aumento de la frecuencia de la micción y la nocturia. Estos síntomas son comunes con la hiperplasia benigna. En estadíos avanzados suele presentarse retención urinaria y dolor lumbar ¹⁰⁵.

3.3. Receptor de Andrógenos (RA)

Los andrógenos median el crecimiento y funcionamiento de la próstata normal a través de la interacción con el receptor de andrógenos (RA), responsable de mediar los efectos del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en este órgano ⁹⁷. El RA es una proteína de 919 aminoácidos con una masa de 110 kDa, que forma parte de la familia de los receptores nucleares de hormonas, como el receptor de estrógenos, el de progesterona y los glucocorticoides. El gen que codifica al RA se encuentra en el cromosoma X (q11-12) y está conformado por 8 exones. Estructural y funcionalmente, el RA se encuentra formado por cuatro dominios distintos: un N-terminal (NTD) pobremente conservado, el de unión al ácido desoxiribonucleico (ADN) (DBD) altamente conservado, y uno de unión al ligando (LBD), moderadamente conservado. Además, presenta una pequeña secuencia de aminoácidos llamada región puente que se separa las regiones LBD y DBD, y que contiene la secuencia de señal de localización nuclear dependiente de ligando bipartito (NLS por sus siglas en inglés) para el transporte del RA al núcleo ¹⁰⁶.

A Activación del RA



B Proteína RA

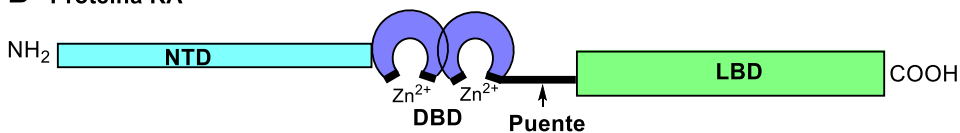


Figura 9. Receptor de andrógenos (RA), activación y dominios. **A.** Activación del RA en células de próstata. La testosterona ingresa a la célula y es transformada en DHT por acción de la 5α-reductasa. La DHT se une al RA y promueve la disociación de las chaperonas, la dimerización del RA y la translocación al núcleo, donde se une a los sitios ARE en el promotor de los genes diana del RA como el PSA. En el promotor, el RA es capaz de reclutar miembros de la maquinaria de transcripción basal como TBP y TFIIIF, además de otros coactivadores como las proteínas que forman parte de la familia de p160. **B.** Proteína representativa del RA. Se presentan cada uno de los dominios que conforman al receptor: en color celeste el dominio NTD, en violeta el dominio DBD y en verde a LBD. SHBG: Globulina sérica de unión a hormonas sexuales, DHT: Dihidrotestosterona, RA: Receptor de andrógenos, HSP: Chaperona, CBP: Proteína de unión a CREB (proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico), TBP: Proteína de unión a la caja TATA, TFIIIF: Factor de transcripción IIF, ARE: Elemento de respuesta a andrógenos, PSA: Antígeno prostático específico, TMPRSS2: Proteasa de transmembrana, serina 2, NTD: Dominio N-terminal, DBD: Dominio de unión al ADN, LBD: Dominio de unión al ligando. Adaptado de *Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery*. Doi: 10.1038/aps.2014.18.

Normalmente el RA se encuentra en el citoplasma unido a proteínas chaperonas como las Hsp 90, -70, -56, y en presencia de su ligando nativo la 5α-dihidrotestosterona (DHT) o la testosterona, cambia su conformación estructural, se libera de las chaperonas y el complejo RA-ligando se homodimeriza y transloca al núcleo. Una vez en el núcleo, interactúa con una región del ADN específica conocida como elemento de respuesta a

andrógenos (AREs, por sus siglas en inglés), recluta corepresores o coactivadores y promueve la transcripción de proteínas dependientes de andrógenos. Esta secuencia de pasos se conoce como la vía genómica clásica del RA o “canónica”, la respuesta puede tardar horas y puede prolongarse en el tiempo.

Existe evidencia de un mecanismo alternativo en la señalización por el RA, que puede llevar solo minutos. Esta segunda vía se conoce como “no canónica” o “no genómica” y es independiente de las acciones del RA sobre el ADN. En la vía no canónica la señalización del RA se limita al citoplasma e involucra la activación de la vía de MAPK, con o sin activación de la vía de ERK, y puede incluir a otras vías como la de PI3K/Akt y mTOR ¹⁰⁷.

3.3.1. Función del RA en el Cáncer de Próstata

La actividad del RA se encuentra íntimamente ligada al CPa. De las 1029 mutaciones encontradas en el gen que codifica al RA, 129, en especial aquellas que alteran la región NTD, predisponen al desarrollo de CPa ⁹⁹.

Por otro lado, se ha reportado que el inicio de esta enfermedad puede ser desencadenado por la activación aberrante de distintas cascadas de señalización, que se relacionan con el RA y promueven la proliferación, llevando a un desbalance en la relación entre muerte celular y proliferación, que controla la renovación del órgano normal. Una alteración muy frecuente, encontrada en más del 50% de los casos de CPa es el reordenamiento cromosómico que origina el gen de fusión *TMPRSS2-ETS*. En estos casos, el estímulo androgénico resulta en el aumento de los factores de transcripción miembros de la familia de E-veintiseis (ETS, por sus siglas en inglés) que conduce a la desregulación del ciclo celular. Otras de las vías normalmente desreguladas en estadios tempranos y tardíos de la enfermedad son PI3K/ATK y RAS/RAF que se encuentran implicadas en la proliferación y supervivencia celular ¹⁰⁶.

Así, las células de CPa, al igual que las de la próstata normal, dependen de los andrógenos para su supervivencia y proliferación. Hace más de 70 años se demostró que la terapia de privación de andrógenos (TDA) produce una regresión significativa de los tumores prostáticos ¹⁰⁸, pero estos tratamientos generalmente derivan en tumores formados por células independientes del RA, y es en este momento que las vías anteriormente mencionadas toman mayor importancia, debido a que posiblemente serán éstas las utilizadas para mantener la viabilidad y supervivencia celular.

3.3.2. *Cáncer de Próstata resistente a la castración (CRPC)*

Si bien después de la TDA se observa una remisión de los tumores prostáticos, en algunos casos total, y una disminución en los niveles de PSA, pasados entre 3 a 5 años la mayoría de pacientes progresa a un cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC, por sus siglas en inglés), etapa avanzada de la enfermedad que hasta el momento no tiene tratamiento efectivo y presenta una tasa de mortalidad elevada. Es interesante recalcar que en varios paciente con CRPC se observó una elevada concentración de PSA circulante, lo que permite concluir que, si bien las células son resistentes a la privación de andrógenos, el RA mantiene una actividad aberrante que les permite sobrevivir y seguir proliferando descontroladamente¹⁰⁹.

Esta actividad del RA puede ser explicada por los siguientes mecanismos (**Figura 10**):

- Amplificación del RA: la sobreexpresión del gen del RA está presente en el 80% de los CRPCs, con un aumento tanto en mRNA como en la proteína, pero no se observó en pacientes sin TDA ¹¹⁰.
- Promiscuidad del RA: existen mutaciones en el RA en aproximadamente el 20% de los CRPCs, la mayoría de las cuales se encuentran en el LBD, permitiendo así la unión de otras hormonas esteroideas e incluso de precursores de las mismas ¹⁰⁷.

- Variantes de splicing del RA: carecen del dominio de unión al ligando y son, por lo tanto, constitutivamente activas al mantener intactos los dominios críticos para la transcripción. Muchas de estas variantes no son detectables por modificaciones en la región LBD; además pacientes con una variante de RA llamada AR-V7 presentan bajos niveles de PSA circulante, aun así la progresión de la enfermedad es acelerada y altamente metastásica ¹¹¹.
- Fosforilación del RA: la fosforilación en el residuo Serina-81 por la CDK-1 sensibiliza la respuesta del RA a bajas concentraciones de andrógenos, permitiendo así su unión al ADN, o presenta constitutivamente fosforiladas regiones que le permiten interactuar con señales que promueven la supervivencia celular a través de la vía no canónica ¹¹².

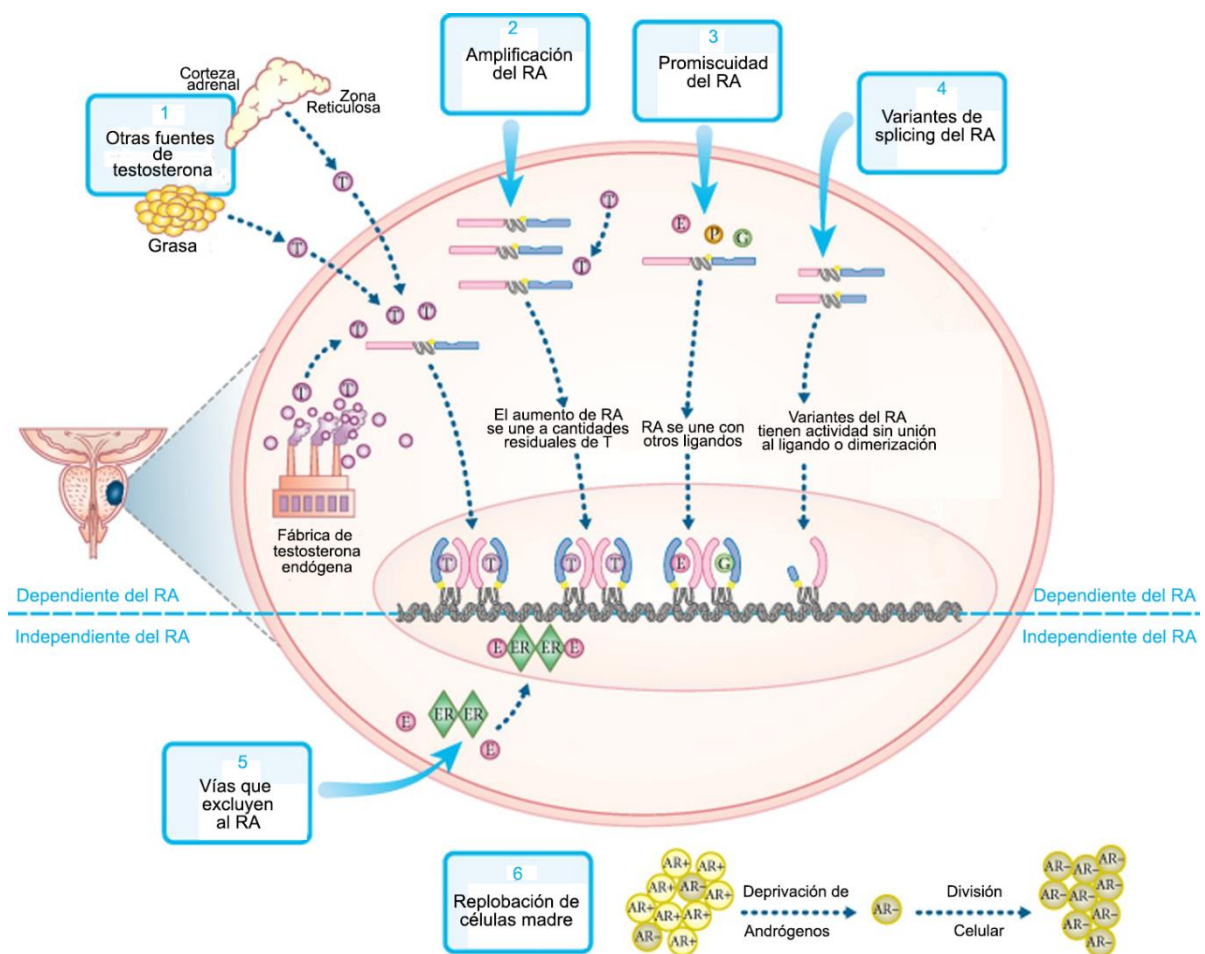


Figura 10. Actividad aberrante del RA en el CRPC. 1. La grasa o la glándula adrenal pueden ser una fuente alternativa de testosterona. 2. Una amplificación aberrante del RA permite que las células sean hipersensibles a bajas concentración de testosterona. 3. La promiscuidad del RA

puede estar ligada a mutaciones en el dominio LBD que le permite unirse a diferentes esteroides. **4.** Se generan variantes de splicing del RA que le permiten unirse al ADN en ausencia de ligando. **5.** Vías que excluyen al RA y usan otros receptores como el de estrógenos. **6.** Surgimiento de células madre tumorales (CSCs) resistentes a los andrógenos que surgen de mutaciones ocurridas debido a la presión de la TDA. RA: Receptor de andrógenos. T: Testosterona. ER: Receptor de estrógenos. E: Estrógenos. P: Progestágenos. G: Glucocorticoides. Gráfico adaptado de *The transcriptional programme of the androgen receptor (AR) in prostate cancer* Doi: 10.1111/bju.12415

Así, aunque el tumor sea resistente a la castración, se recalca que el RA sigue teniendo un rol primordial en el avance de la enfermedad y que las vías torrente abajo del RA son indispensables para la caracterización molecular de esta patología. El conocimiento exhaustivo de estas vías abrirá la posibilidad del desarrollo de nuevas terapias potencialmente efectivas.

3.4. 20-HETE y Cáncer de Próstata

La primera asociación entre el 20-HETE y el cáncer de próstata se estableció en el año 2006 en un estudio en el cual se observó una elevada excreción de 20-HETE en orina en pacientes con cáncer de próstata, que volvía a niveles normales una vez removido el tumor ¹¹³, sin ninguna otra evidencia que asociara a este eicosanoide con la patología.

En el año 2017, resultados de nuestro laboratorio demostraron que el 20-HETE media la viabilidad de células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos (LNCaP). La inhibición de la síntesis de 20-HETE disminuye la viabilidad y la proliferación celular espontánea o inducida por DHT, y aumenta la apoptosis celular ²⁴. Estos resultados constituyeron un importante estímulo para profundizar el estudio del papel de este eicosanoide en la biología de células de cáncer de próstata, tema que desarrollaremos en el presente trabajo de tesis.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1. Hipótesis

Tomando como base los resultados previos de nuestro laboratorio que demuestran el papel del 20-HETE en el sostenimiento de la viabilidad de las células LNCaP inducida por andrógenos, planteamos la hipótesis de que el 20-HETE participa en la señalización intracelular del receptor de andrógenos, que promueve la supervivencia de células LNCaP. Por otra parte, en base a la evidencia de que el 20-HETE aumenta la viabilidad de las células LNCaP en cultivo, también en medio deprivado de esteroides ²⁴, surge la hipótesis de que el 20-HETE podría activar asimismo vías intracelulares de forma independiente del RA, tal como ha sido sugerido en otros modelos tumorales ^{79,93}.

1.2. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es indagar sobre los mecanismos intracelulares comprometidos en las acciones protumorigénicas del 20-HETE en células de cáncer de próstata de origen humano.

1.3. Objetivos específicos

- Determinar si el 20-HETE modifica la actividad transcripcional del receptor de andrógenos en células de cáncer de próstata sensibles a los andrógenos (células LNCaP).
- Identificar posibles vías intracelulares activadas por el 20-HETE en células de cáncer de próstata no sensibles a los andrógenos (células PC-3).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Drogas y Reactivos

El ácido 20-hidroxi-eicosatetraenoico (20-HETE) y la N-hidroxi-N'-(4-n-butyl-2-metilfenil) Formamidina (HET0016), un inhibidor selectivo de la síntesis de 20-HETE (ambos de Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI; EEUU), fueron disueltos en etanol absoluto bajo atmósfera de nitrógeno y guardados a -70°C como soluciones stock (100 µM y 10 mM respectivamente) para la preparación de soluciones madre (concentraciones para 20-HETE 20 µM y para HET0016 10 µM), que fueron mantenidas a -70°C hasta la preparación extemporánea de la solución de droga en medio de cultivo.

Ambos, el aspartato de sodio ((6Z, 15Z)-20-hidroxi-eicosa-6,15-dienol)(AAA), y el aspartato de sodio 19(R)-hidroxi-eicosa-5(Z), 14 (Z)-L-dienol (19-HEDE), antagonistas del receptor GPR75, fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. John Falk (UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, EEUU), quien los cedió generosamente. Se disolvieron en etanol absoluto en atmósfera normal a una concentración de 10 mM para ambos casos y se almacenaron a -70°C hasta el momento de uso.

Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO; EEUU). La 5α-dihidrotestosterona (DHT, agonista del receptor de andrógenos) se disolvió en etanol absoluto a una concentración de 3,44 mM y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Respecto de los inhibidores LY294002 (PI3K), sulfasalazina (NF-κB) y RO318220 (PKC), tanto el LY294002 como la sulfasalazina se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración de 10 mM y 500 mM respectivamente. Las soluciones de RO318220 se prepararon en H₂O tipo I con una concentración de 4.15 mM. Todas las soluciones se almacenaron a -20°C hasta el momento del uso.

Para todos los experimentos se utilizó como control el vehículo de dilución de las drogas (etanol absoluto o DMSO) en la dilución correspondiente a la mayor concentración de droga a las que fueron expuestas las células en cada experimento, que en ningún caso superó el 0.1% del vehículo en concentración final.

1.2. Composición de los Buffers utilizados

PBS: Cloruro de sodio (NaCl) 137 mM; cloruro de potasio (KCl) 2,7 mM; fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4) 10 mM y fosfato di ácido de potasio (KH_2PO_4) 1,8 mM, disuelto en agua Tipo I y llevado a pH 7.40. Para el uso de PBS en cultivo celular, el buffer preparado y aforado fue esterilizado por autoclave a 120°C.

Buffer de lisis: Tris base 10 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100® 1%, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM, ácido etilenglicoltetracético (EGTA) 1 mM, pirofosfato de sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10(\text{H}_2\text{O})$) 10 mM, ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) 10 mM, y fluoruro de sodio (NaF) 100 mM, enriquecido con un cóctel comercial de inhibidores de proteasas (cOmplete™, Mini, EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim; Alemania), disuelto en agua Tipo I. El buffer de lisis fue almacenado a -20°C sin el coctel de inhibidor de proteasas, el cual fue adicionado al buffer en el momento de uso.

Fraccionamiento celular

Buffer de lisis y de lavado de fraccionamiento: EDTA 5 mM, Ditiotreitól (DTT) 1 mM, enriquecido con coctel de inhibidor de proteasas, disuelto en PBS. El buffer fue preparado de forma extemporánea. Para el caso del buffer de lisis se adiciona Igepal®, concentración final 1%.

Buffer nuclear: Tris base 20 mM (pH 7,4); dodecilsulfato de sodio (SDS) 1%; EGTA 5 mM; Triton X-100 ® 0,5%, NaCl 150 mM, con coctel de inhibidor de proteasas y disuelto en agua Tipo I.

Buffer de homogenización: Tris base 20 mM (pH 7.4); EDTA 4 mM; β -mercaptoetanol 10 mM; con coctel de proteasas, disuelto en agua Tipo II. Buffer preparado de forma extemporánea. Para la separación entre fracción microsomal y de membrana se adicionó al buffer Triton X-100 ®, concentración final 1%.

Western Blotting

Buffer de siembra: Tris base 250 mM; SDS 8%; Glicerol 40%; β -mercaptoetanol 10% con 10 μ L de azul de bromofenol 0,001%. La composición de la alícuota de siembra fue: muestra 75% y buffer de siembra 25%. Así preparadas, las muestras se almacenaron a -20°C.

Buffer de corrida: Tris base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0.1%. Se ajusta a pH 8.3 y se almacena a 4°C.

Buffer de transferencia: Tris base 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20%. Se almacena a 4°C.

TBS-T: Tris base 20 mM; NaCl 150 mM; Tween-20 ® 0.1%. Se lleva a pH 7.6 y se almacena a 4°C.

Buffer de stripping: Glicina 19,8 mM; SDS 0.1 %; Tween -20 ® 1%. Se ajusta a pH 2.2 y se almacena a temperatura ambiente.

Zimografía

Buffer de incubación: Tris base 250 mM; NaCl 1.0 M; CaCl₂ 25 mM. Se ajusta a pH 8,0 y se almacena a 4°C.

Buffer de lavado: Triton x-100 ® 2% en H₂O tipo II. Se prepara de forma extemporánea.

Solución de Azul de Coomasi: Azul de Coomasi (BioRad Laboratories, Hercules, CA; EEUU) 0.2% en solución de desteñido.

Solución de desteñido: Ácido acético 10%; metanol 20%; disuelto en H₂O tipo II. Se almacena a 4°C.

Inmunofluorescencia Indirecta

Medio de montaje Mowiol: Tris-HCl (pH8.5) 0.1 M; Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO; EEUU) 9.6%, Glicerol 24%, disuelto en H₂O tipo II y almacenado a -20°C.

1.3. Medios utilizados en cultivo celular

Para ambas líneas celulares utilizadas:

Medio Completo (MC): RPMI 1640 (Gibco- Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; EEUU) suplementado con penicilina (100UI/mL), estreptomina (100 µg/mL) y anfotericina B (2,5 µg/mL) (Life Technologies, Carlsbad, CA; EEUU) y suero fetal bovino (SFB) (10%) (Natocor, Córdoba; Argentina).

Medio Deprivado de Suero (MD): Se preparó de la misma manera sin el agregado de SFB.

Azul de tripán: Solución de azul de tripán 0.4% en PBS utilizada para el conteo de células viables.

Para la línea celular LNCaP:

Medio deprivado de esteroides (MDE): medio preparado con RPMI 1640 sin rojo fenol (dado que este indicador de pH actúa como un agonista parcial del receptor de estrógenos)¹¹⁴; con SFB charcolizado (CH-SFB) (10%), suplementado con penicilina (100UI/mL), estreptomina (100 µg/mL) y anfotericina B (2,5 µg/mL).

El CH-SFB es SFB tratado con carbón activado (2,5%) y dextrán (0,25%) por 1h a 45°C, a efectos de adsorber los esteroides y sus precursores presentes en el mismo¹¹⁵.

1.4. Reactivos para cultivo de bacterias

Medio LB (Luria-Bertani): Extracto de levadura 0.5%; Peptona de caseína 1%; NaCl 0.5%. Se ajusta el pH a 7 y se autoclava. Se almacena a 4°C.

Medio LB-Agar: Agar-agar 1.5% en medio LB preparado fresco. Se autoclava y se utiliza en el momento.

Solución TSS: Medio LB 85%; DMSO 5%, MgCl₂ 50 mM, PEG 6000 7.5%. Se ajusta el pH a 6.5, se autoclava y se almacena a 4°C.

Solución SOC: Se prepara solución SOB+MgCl₂ (Extracto de levadura 0.5%, peptona de caseína 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM) y se adiciona glucosa 20 mM. Una vez filtrada a través de un papel con poro de 0.2 µm, se conserva en la heladera.

Ampicilina: Se prepara una solución madre de ampicilina 100 mg/mL en agua tipo I. Para el uso tanto en placas Petri de cultivo, como en medio LB líquido se usa una concentración final de 100 µg/mL.

1.5. Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti Receptor de Andrógenos (RA) (ID#sc7305, 1/750), Vimentina (ID#sc32322, 1/200), EGFR (ID#sc373746, 1/100; p-EGFR (Tyr 1092) ID#sc377547, 1/100), NF-κB (ID#sc8008, 1/5000; p-NF-κB(Ser 536) ID#sc136548, 1/200), AKT (ID#sc8312, 1/200; p-AKT(Ser 473) ID#sc7985, 1/100), p38 (ID#sc7972, 1/100; p-p38(Try182) ID#sc-166182, 1/100), FAK (ID#sc271126, 1/200) and PKCα (ID#sc208, 1/500). Todos ellos fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Los anticuerpos: E-cadherina (ID#3195, 1/1000) y β-actina (ID#4970, 1/1000) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Los anticuerpos anti HIC-5 (ID#PA5-28839, 1/3000) y anti p-FAK (Tyr397) (ID#44625G, 1/1000) fueron de Thermo Scientific (Rockford, IL; EEUU). El anti GPR75 (ID#ab75581, 1/750) fue adquirido en Abcam (Cambridge; UK), y el anticuerpo anti GAPDH (ID#MAB374, 1/1000) en Merck (Millipore, Darmstadt, Germany). Los anticuerpos policlonales anti-conejo (ID#7074S, 1/5000, Cell Signaling Technology) o anti-ratón (ID#NA931VS, 1/10,000, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; o

ID#sc516102, 1/6500, Santa Cruz Biotechnology) se encuentran conjugados a la peroxidasa de rábano picante (HPR, por sus siglas en inglés) y fueron utilizados como segundos anticuerpos.

Para los ensayos de inmunofluorescencia, se utilizó faloidina conjugada a rodamina (#P1951, 1/200, Sigma-Aldrich) y anti α -tubulina (ID#sc58666, 1/200, Santa Cruz Biotechnology). El 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1/750) fue obtenido de Thermo Fisher Scientific. Todos los primeros anticuerpos fueron mencionados anteriormente. El anticuerpo anti-ratón acoplado a rodamina (ID# 115-025-072, 1/500) y el anticuerpo secundario anti-conejo (ID#711-165-152, 1/800) de Jackson (Immunoresearch, West Grove, PA, USA) fueron utilizados para estos ensayos.

1.6. Plásmidos

Se utilizó el plásmido reportero PSA-Luc, el cual tiene como base el vector pGL3-Basic de Promega (Madison, WI, USA) con la secuencia de PSA con una región-E4 TATA en el sitio *SacI/XhoI* del vector ¹¹⁶. El plásmido fue amablemente cedido por la Dra. Elba Vazquez del Laboratorio de Inflamación y Cáncer del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (IQUIBICEN)-CONICET.

1.7. Líneas celulares

Se utilizaron 2 líneas celulares de cáncer de próstata humana:

- **LNCaP**: línea celular de un adenocarcinoma humano, derivada de una metástasis en un nódulo linfático supraclavicular. Su principal característica es su sensibilidad a los andrógenos, y en respuesta a estas hormonas las células expresan y secretan al medio de cultivo el antígeno prostático específico (del inglés, PSA) ¹¹⁷.

- **PC-3:** línea celular de un adenocarcinoma grado IV humano, derivada de una metástasis en hueso. Su principal característica es su insensibilidad a los andrógenos, glucocorticoides y factores de crecimiento epidérmicos o fibroblásticos¹¹⁸.

Las células LNCaP fueron un obsequio de la Dra. Paula Sacca del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET, Buenos Aires, mientras que las células PC-3 fueron gentilmente cedidas por la Dra. Elba Vázquez.

2. **MÉTODOS**

2.1. Mantenimiento de las células en cultivo

Las células de ambas líneas fueron mantenidas a 37°C en una estufa gaseada con 5 % de CO₂ por hasta 8 semanas, y no más de 30 pasajes para LNCaP y 50 pasajes para las células PC-3. El cultivo se realizó en **medio completo** en botellas plásticas de 75cm² hasta que se formara una monocapa celular.

Para repicar las células, se lavó una vez con PBS estéril para remover los restos de suero que contienen inhibidores de tripsina, se agregó una solución de tripsina 0,02 mM y EDTA 0,48 mM y se incubó a 37°C hasta que, al observar al microscopio, las células se hubiesen desprendido del sustrato. La tripsina fue rápidamente inactivada en medio completo fresco.

Para la conservación de las líneas celulares, las células que hubieran alcanzado el 80 % de confluencia fueron tripsinizadas y centrifugadas a 2900 xg por 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en SFB 20 % con DMSO 5 %, usando como diluyente RPMI 1640. Se fraccionó en alícuotas de 1 mL (que contuvieran 2-2.5x10⁶ células) en criotubos y se colocaron en el dispositivo para congelación controlada Mr. Frosty (ThermoScientific, Rockford, IL; EEUU) a -80°C. Luego de 24 h los criotubos se transfirieron a nitrógeno líquido.

En los experimentos que requirieron la sincronización de las células, el medio completo se reemplazó por **medio privado de suero** por 24 h.

Cuando el cultivo de células LNCaP requirió minimizar el estímulo producido por los esteroides o sus precursores, se utilizó **medio privado de esteroides**. Esta estrategia ha sido previamente usada por otros autores y en nuestro laboratorio debido a que los esteroides, naturalmente presentes en el suero, pueden actuar como precursores de la DHT o agonistas del RA, resultando en un estímulo basal constante y/o interactuando con los agonistas agregados al medio. Esto dificultaría el establecimiento de una relación cuantitativa entre el efecto observado y la concentración del agonista agregado al medio de cultivo ²⁴.

2.2. Caracterización del Receptor GPR75

2.2.1. Inmunodetección por Western Blot

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos, en una densidad de 5×10^5 células para LNCaP y $2,5 \times 10^5$ de células para PC-3. Al llegar a una confluencia del 70 – 80 %, se realizó un lavado con PBS y se cambió el medio por medio completo fresco o medio privado de suero por 24 h según las características del experimento. Se realizaron los estímulos correspondientes durante los tiempos indicados, luego de los cuales las células se colectaron por tripsinización.

Para todos los experimentos, el método de extracción de proteínas se describe en el punto 2.6.2, y la determinación de la concentración proteica en el punto 2.6.3.1. La expresión del receptor GPR75 se analizó por Western Blot según se describe en el punto 2.6.3.2. La especificación de los anticuerpos utilizados se encuentra en el punto 1.3.

2.3. Interacción entre el RA y el eje 20-HETE-GPR75

2.3.1. Expresión del RA

Se sembraron células LNCaP en placas de 6 pocillos (4×10^5 por pocillo) en medio completo hasta obtener una confluencia del 70 – 80 %. Se cambió a medio deprivado de esteroides 24 h antes de los estímulos, que se mantuvieron durante 36 h. Se almacenó el medio condicionado (SN) para la medición de PSA, mientras que la monocapa celular fue colectada y se extrajo las proteínas para la determinación de RA y GPR75 por Western Blot (detallado en el punto 2.6.3.2). Los estímulos con 20-HETE y 19-HEDE se renovaron cada 24 h.

2.3.2. Translocación del RA

Fundamento: La respuesta del RA al estímulo con DHT, por la vía genómica, se inicia con la dimerización del receptor y su translocación al núcleo, donde desencadena la transcripción de diferentes proteínas que promueven la supervivencia y proliferación celular. Así, la translocación al núcleo es reflejo de la activación del RA.

Metodología: Se utilizaron células LNCaP (1×10^5) sembradas sobre cubreobjetos redondos de 12 mm ubicados en placas de cultivo de 24 pocillos. Al llegar a una confluencia del 70 % se cambió el medio a medio deprivado de esteroides (24 h) y se realizaron los estímulos correspondientes. Los vidrios fueron preparados como se indica en el punto 2.6.3.2. Para las tinciones se incubó (1 h, TA o 16 h a 4°C) con anticuerpo anti RA (1/50), DAPI (1/750, marcación nuclear) y faloidina (1/400, marcación de actina para delimitar el citoplasma celular). Se realizó la observación utilizando el microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón). El análisis cuantitativo de la distribución del RA se realizó utilizando el programa FIJI-Image J 1.51j8. Los resultados se presentan como la relación de la intensidad media de la señal del RA entre el núcleo y el citoplasma.

2.3.3. Cuantificación de antígeno prostático específico (PSA)

Fundamento: El PSA es una glicoproteína de 34kDa producida casi exclusivamente por las células de la glándula prostática. El promotor del gen que codifica para el PSA posee sitios AREs a los que se une el RA. Así, la medida del PSA refleja la activación del RA.

Metodología: La cuantificación de PSA en los medios condicionados obtenidos en el punto 2.3.1 se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el equipo comercial ARCHITECT Free PSA® en el autoanalizador Architect SR2000 (Abbott Ireland, Diagnostics Division, Sligo; Irlanda). Los resultados se refirieron al contenido de proteínas de la monocapa celular y se expresaron como ng de PSA/mg de proteína.

2.3.4. Ensayo del gen reportero para expresión de PSA

Fundamento: La transfección de las células con un vector que incluye una parte de la secuencia del promotor de PSA unido a la secuencia de la luciferasa, permite que la activación de la transcripción de PSA por estímulo del RA ocurra conjuntamente a la transcripción de luciferasa, permitiendo la medida indirecta de la actividad transcripcional del RA a través de la medición de la luciferasa producida.

Metodología: Se detalla a continuación cada paso seguido para este ensayo:

2.3.4.1. Amplificación de los vectores de expresión

2.3.4.1.1. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias competentes se prepararon partiendo de una cepa de *Escherichia coli* XL-Gold, la cual fue plaqueada en medio completo de Luria-Bertani (LB) agar sin antibióticos durante toda la noche a 37°C. Se eligió una de las colonias formadas y se la pasó a 10 mL de medio LB en un tubo bacteriológico. Se incubó toda la noche en la estufa con agitación a 37°C, después de lo cual se pasó el contenido a 100 mL de LB y se incubó a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0,5 a 600 nm. Las bacterias obtenidas fueron fraccionadas en tubos Falcon de 50 mL y mantenidas en cama de hielo

(20 min), después de lo cual se centrifugó (2900 xg, 5 min, 4°C) hasta obtener un pellet que fue resuspendido en 5 mL de TSS frío (composición en el punto 1.2). Se incubó durante 1 h en hielo con agitación suave y se resuspendió el pellet en medio LB para fraccionar en tubos eppendorf de 1.5 mL y almacenar a -70°C.

2.3.4.1.2. Transfección de bacterias competentes

En un tubo con 200 µL de bacterias competentes, se transfirió 3 µL del plásmido PSA-Luc o del plásmido EMPTY y se incubó en hielo (30 min), seguido de un baño de calor a 42°C (45 s) y un choque térmico de 5 min en hielo. Se adicionó al tubo 150 µL de SOC (detallado en 1.4) y se incubó en la estufa con agitación (1 h, 37°C). La mezcla obtenida se transfirió a una placa de LB-agar con ampicilina (100 µg/mL) y se dejó incubando durante toda la noche a 37°C.

Se eligió una de las colonias formadas, se sembró en 2 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

2.3.4.1.3. Aislamiento del ADN plasmídico

Para el aislamiento del ADN plasmídico se utilizaron las columnas EconoSpin™ sw (Epoch Life Science, Ciudad de Misuri, TX, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.3.4.2. Ensayo de gen reportero

2.3.4.2.1. Transfección de células con el gen reportero

Se sembraron células LNCaP en placas de 24 pocillos (1 x 10⁵ células por pocillo) y se mantuvieron en medio completo hasta llegar a una confluencia entre 70 – 80 %. Para la transfección de los plásmidos PSA-Luc, o el plásmido control (EMPTY), se usó

Lipofectamina™ 3000 Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL; EEUU) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En ensayos preliminares se estableció 1 µL por pocillo como cantidad óptima de lipofectamina por cada 0.5 µg de plásmido.

Después de 6 h de realizada la transfección, se cambió el medio de las células por medio completo. Pasadas las 24 h, se cambió a MDE y se iniciaron los estímulos correspondientes (36 h). Los estímulos con 20-HETE y 19-HEDE se renovaron cada 24 h.

2.3.4.2.2. Ensayo de actividad de luciferasa

La actividad de luciferasa en las células transfectadas se cuantificó utilizando el equipo comercial Luciferase Assay System (Promega, Madison, Wc, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la medición se utilizó un lector multimodo de multiplaca modelo Synergy HTX (Biotek, Winooski, Vt, USA) a una longitud de onda 510 nm, propia para la luciferasa. La homologación de los resultados se realizó en función del contenido de proteínas de cada pocillo.

2.4. Ensayos in-vitro para evaluar la capacidad metastásica

2.4.1. Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) – Inmunodetección de e-caderina y vimentina

Fundamento: La TEM es el proceso a través del cual las células de estirpe epitelial pierden sus características (proteínas de unión célula-células, polimerización específica del citoesqueleto, entre otras) y adquieren características mesenquimales. Durante este proceso, las células epiteliales pierden la expresión de e-cadherina y adquieren la expresión de vimentina, propia del fenotipo mesenquimal.

Metodología: El cultivo de células PC-3 se realizó en placa de 6 pocillos según se indica en el punto 2.2.1. Una vez finalizada la incubación con las drogas en estudio, las células

fueron procesadas para la determinación de la expresión de e-cadherina o vimentina por Western Blot de acuerdo a lo descrito en el punto 2.6.3.2.

2.4.2. Actividad de Metaloproteasas de Matriz – Zimografía

Fundamento: Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son enzimas proteolíticas que degradan varios componentes de la matriz extracelular. En el cáncer, estas proteínas se encuentran desreguladas y su actividad aumenta conforme a la capacidad invasiva de las células neoplásicas. La zimografía es una técnica que permite la separación electroforética las MMPs con actividad gelatinasa (MMP-9, -2), que degradan la gelatina embebida en un gel de poliacrilamida. El revelado de la zimografía se realiza a través de la inmersión del gel en azul de coomasie (detallado en el punto 1.2) que permite la observación de las bandas.

Metodología: Las células PC-3 se sembraron como se especifica en el punto 2.2.1, hasta confluencia del 80 – 90 %. Se privaron de suero y se realizaron los estímulos correspondientes (24 h). Se recolectó el medio condicionado para zimografía y la monocapa celular para la extracción y determinación de proteínas (puntos 2.6.1, 2.6.3.1 respectivamente).

Se prepararon geles de poliacrilamida al 9 % con agregado de gelatina 1 % y se sembró el volumen de medio condicionado que correspondía a igual cantidad de proteínas extraídas de la monocapa celular y se realizó la corrida electroforética como se especifica en el punto 2.6.3.2. El gel fue lavado con una solución de Triton-X100 ® 2 % (3 x 15 min), seguido de lavados con agua destilada (3 x 5 min), y posteriormente incubado en buffer de incubación (24 h a 37°C). Finalmente, se tiñó en la solución de Azul de Coomasie (20 min), seguido de la decoloración con solución de desteñido hasta transparencia. Los geles fueron escaneados y se realizó la cuantificación densitométrica de las bandas utilizando el software ImageJ 1.51j8 ¹¹⁹. La composición de las soluciones utilizadas se encuentra especificado en el punto 1.2.

2.4.3. Caracterización de proteínas involucradas en el citoesqueleto

Fundamento: Como parte de la TEM y del proceso de migración celular es indispensable para las células la reestructuración del citoesqueleto. Este se encuentra formado por una serie de proteínas estructurales que tienden una malla a lo largo de la célula, dándole la forma característica a la misma y participando en procesos dinámicos celulares, como el movimiento de organelas, movimiento y posicionamiento celular. Para el estudio de los cambios en el citoesqueleto se utilizaron dos anticuerpos primarios: α -tubulina que es una de las subestructuras que conforman los microtúbulos celulares. Los filamentos de actina se estudiaron con ayuda de la toxina fúngica faloidina que presenta afinidad por las estructuras filamentosas de la proteína y no por los monómeros.

Metodología: Se sembró 8×10^3 células PC-3 sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro ubicados en placas de cultivo de 24 pocillos. Al llegar a una confluencia del 50 % se cambió a medio sin suero y se iniciaron los estímulos (24 h). Se fijaron las células (procedimiento descrito en el punto 2.6.3.2) y se incubaron con los anticuerpos primarios anti- α -tubulina y faolidina ligada a Alexa Flour 455, siguiendo lo establecido en el punto 2.6.3.3.

2.4.4. Migración celular – Ensayo de cierre de herida

Fundamento: *In vitro*, la migración celular se mide según el tiempo requerido para cerrar una herida realizada en una monocapa celular confluyente. La motilidad celular observada en este ensayo correlaciona con la capacidad de migración celular *in vivo*.

Metodología: Se sembraron células PC-3 en placas de cultivo de 6 pocillos (3×10^5 por pocillo). Al llegar a una confluencia del 100 % se las deprivó de suero (24 h) y se realizaron 3 heridas con una punta de pipeta de 200 μ l, aplicando en ese momento los estímulos por 16 h. Se tomaron 9 microfotografías por pocillo (tiempo 0 y tiempo final) utilizando un microscopio invertido Nikon Ti3, con una magnificación de 10X. Se

midieron las áreas libres de células del tiempo 0 y tiempo final utilizando el programa ImageJ 1.51j8. Los resultados se expresaron como porcentaje de migración, tomando como base la siguiente ecuación: $100 - ((\text{área final} * 100) / \text{área inicial})$.

2.5. Señalización intracelular

Fundamento: Como respuesta a un estímulo, las células desencadenan una serie de señales intracelulares. En el cáncer existen cascadas de señalización, típicamente desreguladas, implicadas en la supervivencia, proliferación y migración celular, como por ejemplo la sobreactivación de las MAPK a través de la activación de EGFR, la activación de PI3K/AKT, PKC α y HIC-5. El estudio de la activación de las mismas, sea por fosforilación o redistribución intracelular, permite trazar una cascada de respuestas a un estímulo dado, y de esta forma desentrañar los mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad.

2.5.1. Inmunodetección por Western Blot de proteínas fosforiladas

Las células PC-3 se sembraron como se describió en el punto 2.2.1. Cuando alcanzaron una confluencia del 70 – 80 % el MC fue reemplazado por MDS por 24 h, y se realizaron los estímulos correspondientes durante 2 h. Las células se colectaron por raspado de la placa (“rubber policeman”) a T.A. con 90 μ L de buffer de lisis de proteínas (ver punto 1.2), se resuspendieron, se dejaron en reposo (30 min a 4°C) y se centrifugaron (12000 xg, 30 min, 4°C). Se midieron las proteínas (punto 2.6.3.1) y se prosiguió inmediatamente con el western blot (60 μ g de proteína/calle) en gel de poliacrilamida al 10 %. Las membranas se revelaron en primera instancia utilizando los anticuerpos anti p-EGFR, anti p-AKT, anti p-p38 y anti p-NF- κ B. Se realizó un “stripping” de las mismas y se reveló con el anticuerpo anti proteína total.

La técnica de Western Blot, el revelado y el tratamiento de los datos se realizó siguiendo los pasos detallados en el punto 2.6.3.2.

2.5.2. Distribución intracelular de proteínas

Microscopía confocal

Se sembraron 1×10^4 células PC-3 sobre portaobjetos redondos de 12 mm ubicados en placas de cultivo de 24 pocillos. Al llegar a una confluencia de 70 – 80% se las deprivó de suero (24 h) antes de los estímulos específicos (1 h o 10 min). Las células fueron preparadas para su observación por inmunofluorescencia indirecta según se describe en el punto 2.6.3.2. La estandarización y cuantificación de las imágenes se realizaron utilizando el programa FIJI-ImageJ 1.52i.

Fraccionamiento subcelular

La técnica utilizada permite separar tres fracciones: nuclear, citoplasmática, y particulada (enriquecida en membranas celulares y fracción microsomal).

Las células PC-3 se cultivaron en placas de 6 pocillos (punto 2.2.1). Cuando alcanzaron una confluencia del 80 – 90 % se las deprivó de suero por 24 h antes del estímulo (10 min). Se recolectó la monocapa celular procediéndose inmediatamente al fraccionamiento subcelular por ultracentrifugación (punto 2.8.2.1). Se midió la concentración protéica en cada fracción (punto 2.6.3.1). Se realizó un western blot (25 μ g de proteína por calle) para identificar PKC α utilizando e-cadherina y GAPDH como controles de carga de la fracción particulada y citoplasmática respectivamente (punto 2.6.3.2).

2.6. Métodos generales

2.6.1. Obtención de homogenatos celulares

Una vez terminados los respectivos estímulos, se colectó la monocapa celular, se centrifugó (2900 xg, 10 min, 4^oC) y el precipitado se resuspendió en buffer de lisis a 4^oC. Las muestras mantuvieron a 4^oC por 30 min, y se continuó con una centrifugación

(12000 xg, 30 min, 4°C). El sobrenadante resultante se fraccionó para su almacenamiento a -80°C.

2.6.2. Fraccionamiento celular membrana y citoplasma

Las células se transfirieron a tubos eppendorf, y fueron lisadas mediante 3 ciclos de congelado (nitrógeno líquido)/descongelado (placa térmica a 37°C). Los *debris* celulares se descartaron por centrifugación (2900 xg, 10 min, 4°C). El sobrenadante se centrifugó (12000 xg, 10 min, 4°C); se descartó el pellet y el sobrenadante corresponde a la fracción particulada y citoplasmática.

El sobrenadante fue centrifugado (100000 xg, 60 min 4°C) utilizando una ultracentrífuga Sorvall combi plus (Thermo Scientific, Rockford, IL; EEUU). El sobrenadante corresponde a la fracción citoplasmática. El pellet fue resuspendido en buffer de homogenización (punto 1.2), siendo ésta la fracción particulada.

2.6.3. Inmunodetección de proteínas

2.6.3.1. Cuantificación de proteínas totales

Fundamento: El método de Bradford se basa en la unión del colorante a la porción hidrofóbica de la proteína, lo que produce un reacomodo de la estructura del colorante y un cambio de color (de pardo a azul) que llega a una máxima absorbancia a 595 nm, manteniendo un rango de linealidad entre 0,1 y 0,5 mg/mL. Este método fue utilizado para la detección de proteínas en un rango de 1 a 10 mg/mL.

Metodología: El reactivo de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA; EEUU) fue usado según las instrucciones del fabricante. Como estándar de medición se realizó una curva de seroalbúmina bovina (BSA) de 0.1 a 0.5 mg/mL. Las muestras fueron diluídas en un rango entre 1/5 a 1/20 a fin de que su lectura entrara en rango de linealidad. Cada muestra fue medida por triplicado. La reacción se realizó en placa de 96 pocillos. Para

la lectura se utilizó el lector multimodo de multiplaca modelo Synergy HTX (Biotek, Winooski, Vt, USA).

2.6.3.2. Separación por electroforesis – Western Blot

Fundamento: La electroforesis proteica se basa en la separación de proteínas con carga presentes en una muestra sembrada en un gel de poliacrilamida, mediante la aplicación de un gradiente de potencial. La movilidad resulta inversamente proporcional al tamaño de la proteína, que se estima por comparación con un patrón de pesos moleculares. Luego de la transferencia a una membrana, se utiliza un anticuerpo específico para detectar de forma semicuantitativa la proteína de interés.

Metodología: En todos los casos se realizó electroforesis vertical en gel desnaturizante de poliacrilamida utilizando un equipo Mini Protean® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA; EEUU). La concentración del gel utilizado fue del 10 %, con el cual se logró conseguir una separación satisfactoria en el rango de 120 a 28 kDa, donde se encuentran comprendidas la mayoría de las proteínas de interés. Se sembraron 50 µg de proteína por calle, a excepción de los casos de fraccionamiento celular en los cuales se sembraron 25 µg, o para los ensayos de proteínas fosforiladas en los que se utilizaron 60 µg. Las muestras fueron disueltas en loading buffer (composición del buffer en el punto 1.2), y la separación electroforética se realizó a corriente constante de 150 V.

Una vez separadas las proteínas, el gel fue transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF, por sus siglas en inglés) (100 V, 60 min). La membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5 % en TBS-T 0.1 % para el caso de proteínas totales, y para proteínas fosforiladas se utilizó una solución de BSA 3 % en TBS-T 0.1% (1 h, TA), después de lo cual se incubó con un primer anticuerpo específico para la proteína de interés (16 h, 4° C). Se realizaron lavados con TBS-T 0,1 % (3 x 10min) y

se incubó con un segundo anticuerpo con especificidad de especie para el primer anticuerpo conjugado a la enzima HRP (del inglés, horseradish peroxidase) (2 h, T.A.), después de lo cual se repitieron los lavados con TBS-T 0.1 % (3 x 10min). Todas las incubaciones fueron realizadas con agitación utilizando un agitador orbital marca DragonLab (Distrito Shunyi, Beijing, China).

Para el revelado por quimioluminiscencia se utilizó el sistema Amersham [™] ECL [™] Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Lifescience, Pittsburgh, PA, USA). La luminiscencia se reveló en películas fotográficas CL-XPosure Films® (Thermo Scientific, Rockford, IL; EEUU) y las bandas se cuantificaron utilizando el software ImageJ 1.51j8.

En todos los casos, las membranas se “strippearon”, se volvieron a bloquear con leche 5 % en TBS-T 0.1 % y se incubaron con un primer anticuerpo específico para una proteína de control de carga.

2.6.3.3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Fundamento: En esta técnica se aprovecha la capacidad de los anticuerpos de unirse a moléculas específicas dentro de la célula. Los anticuerpos están conjugados a un fluoróforo, que al ser excitado con una longitud de onda específica adquiere fluorescencia. Esto permite la cuantificación bajo microscopio de la fluorescencia emitida en una estructura subcelular particular.

Metodología: Al finalizar los estímulos correspondientes, las células se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS y se fijaron en paraformaldehído 4 % (P/V) en PBS (10 min a T.A.). Se realizaron lavados con PBS (3 x 2 min) y se permeabilizó con Triton x-100® 0.2 % en PBS (10 min a T.A.), seguido de lavados con PBS (5 x 5 min). La unión inespecífica se bloqueó con BSA al 3 % en PBS (1 h) y se repitieron los lavados seguidos de la incubación con las diluciones de los anticuerpos primarios (1 h a TA o 16 h a 4°C).

Nuevamente, se realizaron lavados con PBS (5 X 5 min) y los vidrios se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo (1 h, T.A.). Se realizaron lavados con PBS (2 x 5 min) y se incubó con el marcador nuclear DAPI (1/750 en PBS, 5 min) seguido de lavados con PBS (3 x 5 min). Finalmente, los preparados se montaron con medio de montaje Mowiol® (preparación punto 1.2). Para el caso del citoesqueleto, se tomaron microfotografías utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 fluorescent, mientras que para la redistribución intracelular de proteínas se usó el microscopio de escaneo láser confocal Olympus FLUOVIEW PV1000, (Olympus Corporation, Tokyo, Japón)

2.7. Análisis estadístico de los datos

El ajuste de los datos a una distribución normal se analizó utilizando el test de Shapiro-Wilks. Se usaron los siguientes test paramétricos para los datos que se ajustaron a una población normal: a) el test de Student de dos colas para la comparación de dos condiciones y, b) en los casos en que se compararon más de dos grupos se utilizó el análisis de ANOVA de una vía seguido de una corrección *post-hoc*: Dunnet en los casos en que se comparó solo contra el control, y Tukey para los casos de comparaciones múltiples. En todos los casos se consideró como significativa una $p < 0,05$.

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar (SEM). Las pruebas estadísticas presentadas y los gráficos de las figuras se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (Versión 8.01 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA; EEUU. Website: <http://www.graphpad.com>).

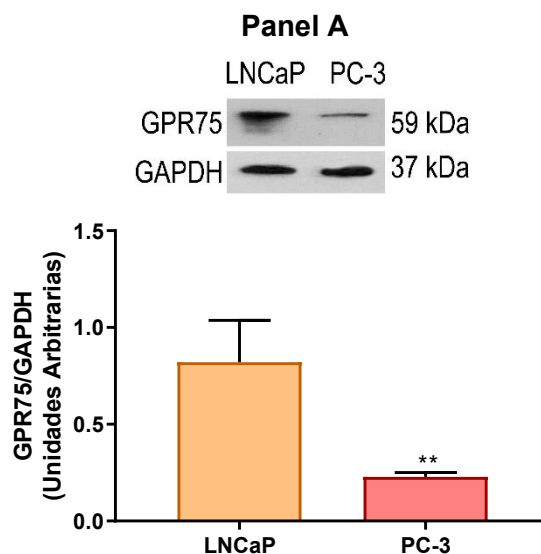
RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR GPR75 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de próstata: células LNCaP sensibles a los andrógenos, y células PC-3 no sensibles a los andrógenos.

En base a resultados previos de nuestro laboratorio que demostraron que el 20-HETE forma parte de la cascada intracelular que sostiene la viabilidad de las células LNCaP, torrente abajo del RA ²⁴; y que en el año 2017 se describió en células del músculo liso la expresión del receptor GPR75 para el 20-HETE ³², surgió la hipótesis de que las células de cáncer de próstata expresan dicho receptor.

Como primer acercamiento, se constató la expresión del receptor GPR75 en ambas líneas celulares en cultivo en medio completo (**Figura. 11. Panel A**), observando que el nivel de expresión de éste en la línea LNCaP es tres veces mayor a la línea PC-3 ($p \leq 0.01$). Además, para ambas líneas celulares la deprivación del suero del medio de cultivo resultó en una sobreexpresión del receptor en un porcentaje de $24.6 \pm 13.7\%$ para LNCaP y $91.5 \pm 36.4\%$ para PC-3 ($p \leq 0.05$ en ambos casos) (**Figura 11. Panel B y C**).



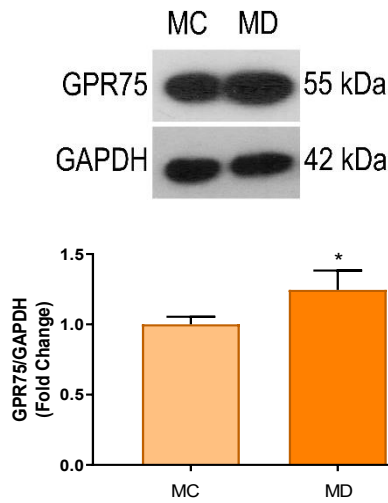
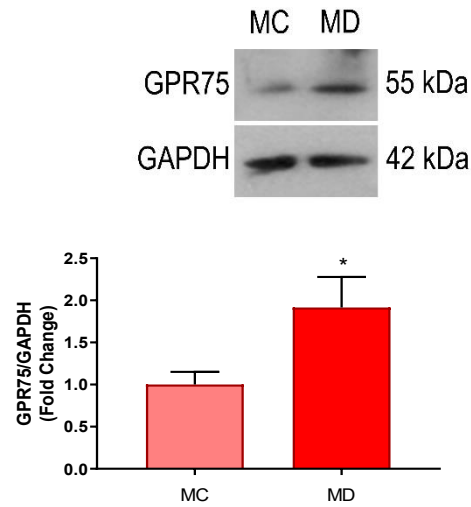
Panel B**Panel C**

Figura 11. Expresión del Receptor GPR75. Panel A. Células LNCaP y PC-3 en medio completo (MC) (n=3, **p<0.01 vs. LNCaP). **Panel B y C.** Células LNCaP (**B**) y PC-3 (**C**). Para ambas líneas celulares se compara la expresión en MC y medio deprivado de suero (MD) durante 24 h (n=3, *p<0.05 vs. MC en ambos casos). En todos los casos se muestra un Western Blot representativo de la expresión del receptor GPR75 en homogenatos celulares. El GAPDH se utilizó como control de carga. La cuantificación se presenta como el coeficiente GPR75/GAPDH y los valores se expresan como la media±SEM

2. CÉLULAS SENSIBLES A ANDRÓGENOS (LNCAP)

2.1. Modulación de la expresión del Receptor GPR75

El aumento de la expresión del receptor GPR75 en medio deprivado de suero, dio lugar a la pregunta de si un cambio similar ocurriría en respuesta a la deprivación de esteroides, moléculas fundamentales para la supervivencia de células LNCaP. El cultivo en medio deprivado de esteroides (24 h) resultó en una sobreexpresión del receptor GPR75 en un 58.3±15.1% (p<0.05 vs MC). **Figura 12 Panel A.**

Por otro lado, el receptor GPR75 es un receptor acoplado a proteína G, y la desensibilización homóloga es una característica de estos receptores. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la exposición al agonista 20-HETE modularía la expresión de GPR75. Las células cultivadas en medio deprivado de esteroides fueron expuestas al agonista o al antagonista. La incubación con 20-HETE (0.1nM, 36 h) disminuyó la expresión del GPR75 en un 76.65±5.53% (p<0.0001 vs control), y este efecto se vio parcialmente revertido por la coincubación con el antagonista del receptor GPR75, 19-

HEDE (5 o 10 μM) ($p < 0.05$ vs 20-HETE solo). El 19-HEDE no tuvo efecto *per se*. **Figura**

12 Panel B.

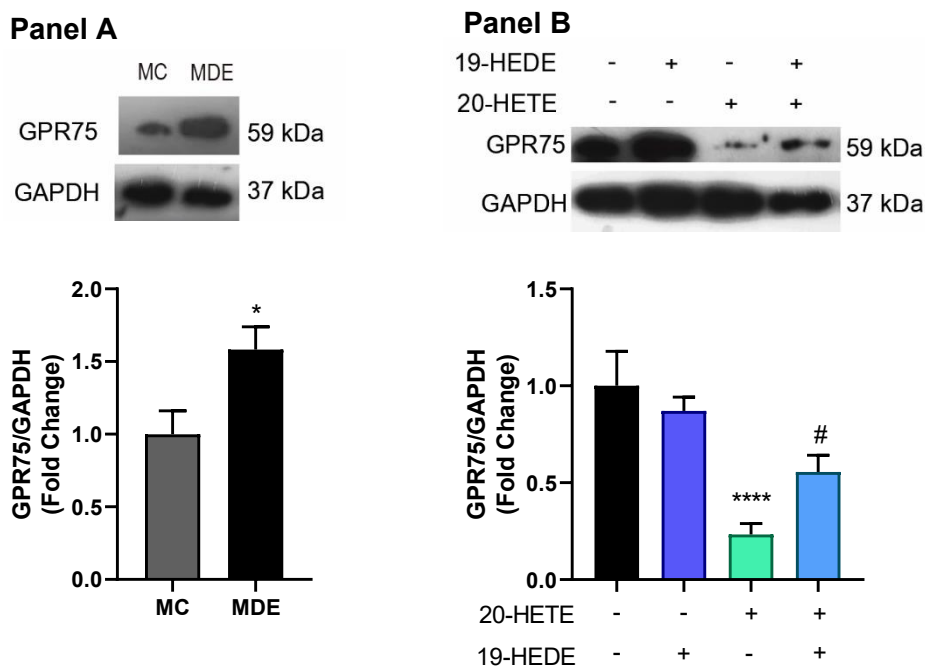


Figura 12. Efectos del 20-HETE sobre la expresión del receptor GPR75 en células LNCaP. **Panel A y B.** Las células fueron cultivadas en medio completo (MC) o en medio deprivado de esteroides (MDE) durante 24h **A.** $n=3$, $*p < 0.05$ vs. MC. **B.** Células en MDE incubadas con 20-HETE (0.1 nM, 36 h) y/o con aspartato de sodio 19(R)-hidroxieicosa-5(Z), 14 (Z)-L-dienol (19-HEDE 5 o 10 μM) ($n=3$) (**** $p < 0.0001$ vs. control (vehículo); # $p < 0.05$ vs. 20-HETE). Western Blot representativo de la expresión del receptor GPR75 en homogenatos celulares. El GAPDH se usó como control de carga. La cuantificación se presenta como el coeficiente GPR75/GAPDH y los valores se expresan como la media \pm SEM.

2.2. Acciones intracelulares del 20-HETE

2.2.1. Modulación de la expresión de receptor de andrógenos por el 20-HETE

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la inhibición de la síntesis de 20-HETE disminuye significativamente la expresión del RA en células LNCaP, tanto a nivel del mensajero como de la proteína²⁴. A partir de este antecedente surgió la pregunta de si esta acción del 20-HETE requiere del estímulo del receptor GPR75. Efectivamente, la incubación con 20-HETE (0.1 nM, 36 h) resultó en un aumento del 37.35 \pm 5.4% en la expresión del RA ($p < 0.01$ vs. control), siendo este efecto revertido por la presencia del antagonista 19-HEDE ($p < 0.01$ vs. 20-HETE solo). **Figura 13.**

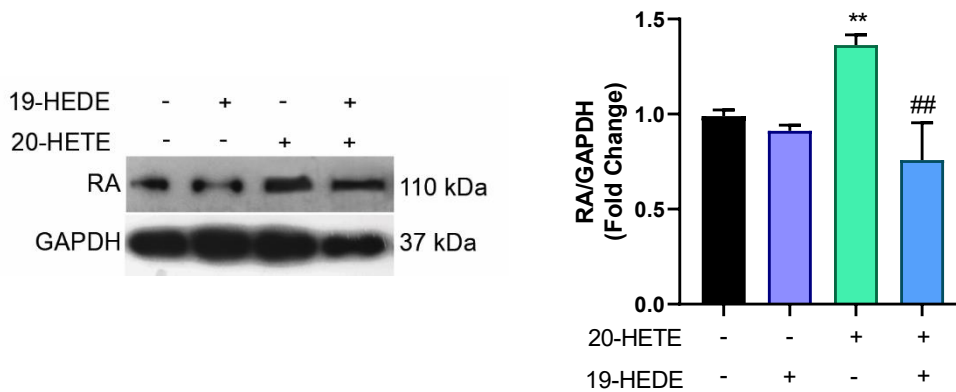
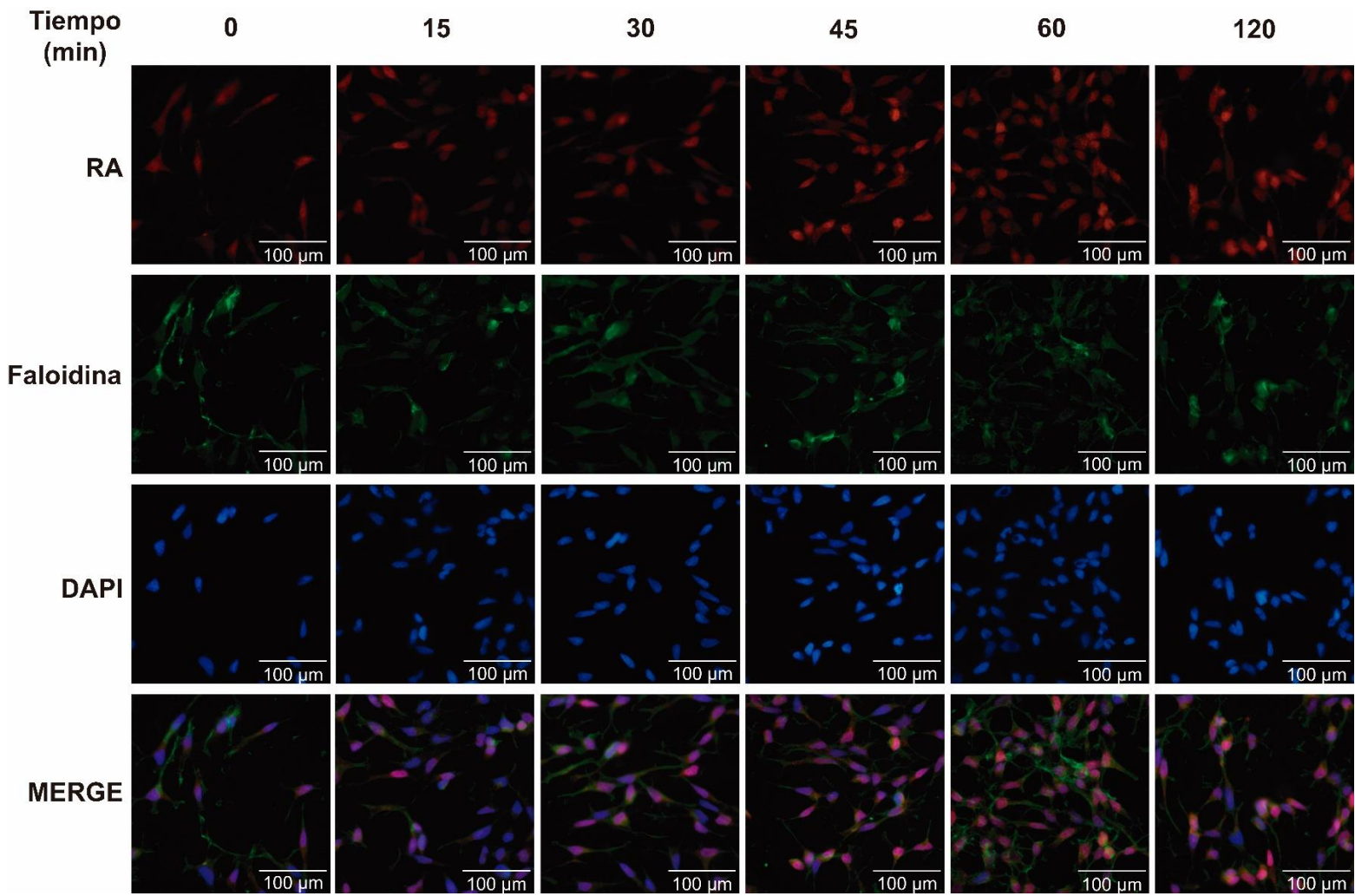


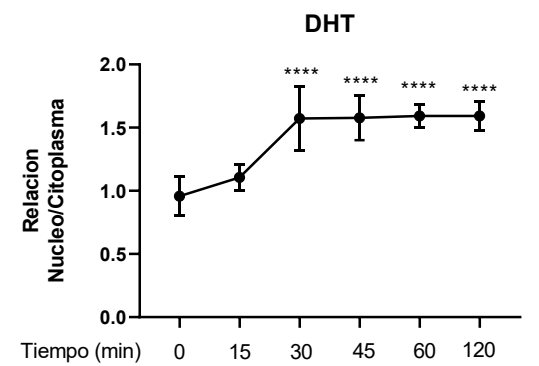
Figura 13. Efectos del 20-HETE sobre la expresión del receptor de andrógenos. Las células LNCaP fueron cultivadas en medio deprivado de esteroides durante 24 h antes del estímulo (36 h) con 20-HETE (0.1 nM), 19-HEDE (5 μ M), o una combinación de ambos. Western Blot representativo de la expresión del RA en homogenatos celulares. El GAPDH se usó como control de carga. La cuantificación se presenta como el coeficiente RA/GAPDH y los valores se expresan como la media \pm SEM. (n=3) (**p<0.01 vs. control; ##p<0.01 vs. 20-HETE solo)

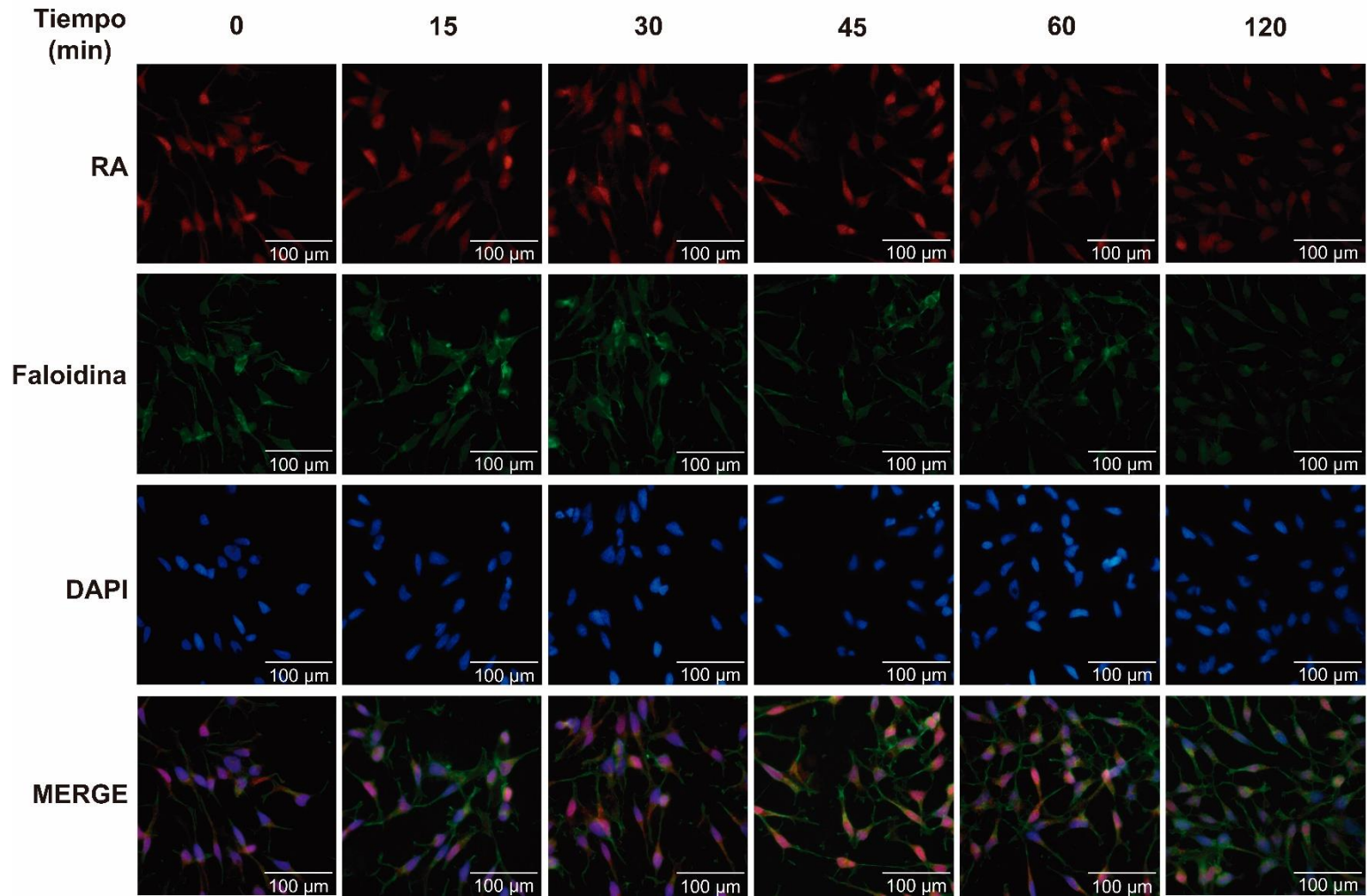
2.2.2. Efectos del 20-HETE sobre la distribución intracelular del receptor de andrógenos

El RA normalmente se encuentra en el citoplasma celular, en presencia de DHT se libera de las chaperonas, dimeriza y se redistribuye hacia el núcleo donde activa la transcripción de los genes bajo su regulación. Como primer acercamiento, utilizado como control positivo, se analizó bajo microscopía de fluorescencia el curso temporal de la redistribución del RA hacia el núcleo en presencia de DHT (10 nM) en células cultivadas en medio deprivado de esteroides. Se evaluó la relación de marca nuclear/marca citoplasmática en función del tiempo. Se observó un aumento en la relación núcleo/citoplasma del RA del 64.2 ± 16.7 % a partir de los 30 min, manteniéndose este valor relativamente constante hasta los 120 min ($p<0.0001$ vs. control para todos los casos). **Figura 14 Panel A.** De modo semejante, al incubar las células con 20-HETE (0.1 nM) se observó un aumento cuantitativamente similar en la relación núcleo/citoplasma del RA del 62.8 ± 17.6 %, pero con un curso temporal ligeramente distinto, ya que se evidenció a los 45 min y se sostuvo hasta los 60 min ($p<0.0001$ vs. control para ambos tiempos), con una tendencia a la disminución a los 120 min, si bien aún significativamente mayor al basal ($p<0.05$). **Figura 14 Panel B.**



Panel A





Panel B

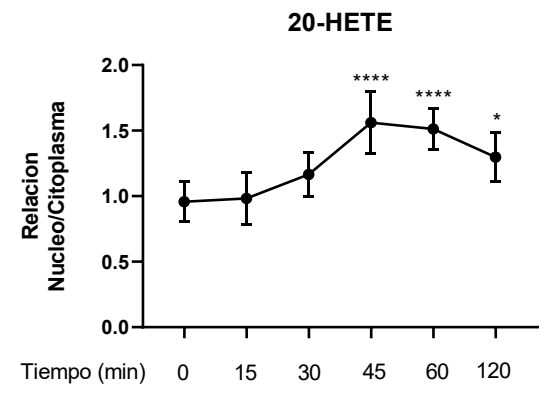


Figura 14. *Curso temporal de la redistribución del receptor de andrógenos hacia el núcleo.* Las células LNCaP se incubaron en un medio deprivado de esteroides por 24 h antes del estímulo de DHT (10 nM) (**A**) o 20-HETE (0.1 nM) (**B**) durante 15, 30, 45, 60 y 120 min. Microfotografías de inmunofluorescencia representativas para cada caso. Rojo: RA, Verde: Citoesqueleto (Faloidina), y Azul: Núcleos (DAPI). La cuantificación se presenta como la relación entre la intensidad media del núcleo / citoplasma. Los valores se expresan como la media±SEM (n=9) (*p<0.05; ****p<0.0001 vs. control).

2.2.3. Efectos del 20-HETE sobre la actividad transcripcional del receptor de andrógenos

2.2.3.1. Ensayo del Gen Reportero

La transfección de células LNCaP con un vector de expresión que contiene una parte de la secuencia del promotor del PSA unido a luciferasa (PSA-Luc) permite cuantificar la actividad transcripcional del RA en respuesta a distintos estímulos.

En experimentos preliminares se corroboró que la exposición a DHT (10 nM, 36 h) en medio deprivado de esteroides, utilizado como control positivo, aumentó la señal de luciferasa en 612±145% únicamente en células LNCaP/PSA-Luc (p<0.0001 vs. control).

En cambio, la DHT no indujo respuesta en las células transfectadas con el vector vacío

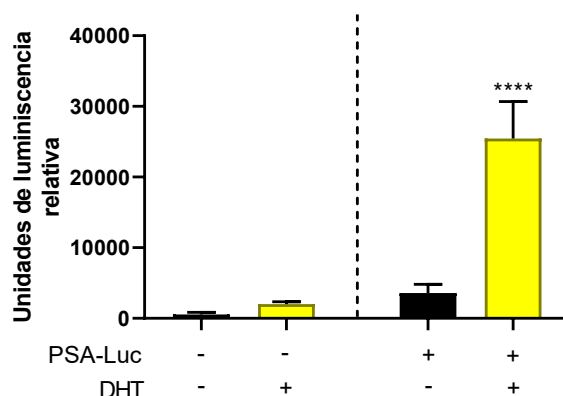
Figura 15 Panel A. Esto prueba la eficiencia de la transfección y la especificidad de la señal.

Para evaluar el efecto del eje 20-HETE / GPR75 sobre la actividad transcripcional del RA, se estimuló las células en medio deprivado de esteroides con 20-HETE (0.1 nM, 36 h) en presencia/ausencia 19-HEDE (10 µM). En estas condiciones el 20-HETE aumentó la señal de luciferasa en un 178±63 % (p<0.0001 vs. control), siendo este efecto disminuido por la presencia del 19-HEDE (p<0.01 vs. 20-HETE solo)., Más aun, el 19-HEDE por si solo disminuyó significativamente la actividad basal de luciferasa en un 47.8±14.5 % (p<0.0001 vs. control). **Figura 15 Panel B.**

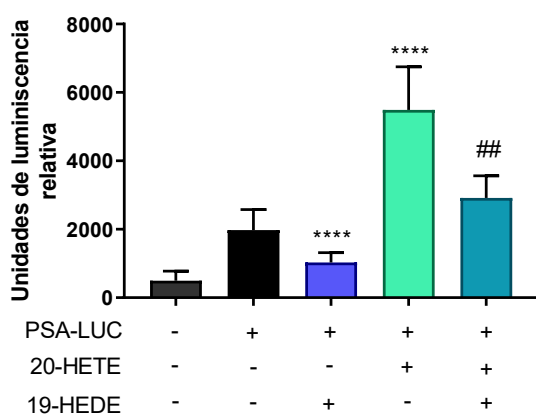
A fin de esclarecer si existe un efecto sinérgico entre el 20-HETE y la DHT sobre la actividad transcripcional del RA, las células se coincubaron con ambas drogas. La DHT

sola aumentó en un 1478 ± 388 % la actividad de luciferasa ($p < 0.0001$ vs. control). La presencia del 20-HETE aumentó la actividad de luciferasa en un 58 ± 29 % por sobre el efecto de la DHT ($p < 0.0001$ vs. DHT), y este efecto fue completamente revertido por el 19-HEDE ($p < 0.0001$ vs. 20-HETE+DHT). **Figura 15 Panel C.**

Panel A



Panel B



Panel C

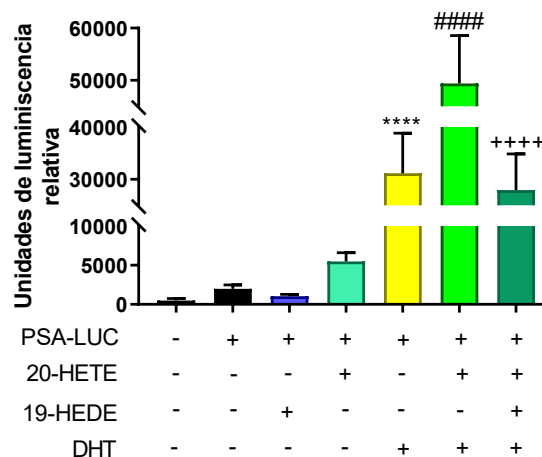


Figura 15. Efectos del 20-HETE sobre la actividad transcripcional del receptor de andrógenos. Las células LNCaP fueron transfectadas con el vector PSA-Luc o el plásmido vacío. Después de 24 h, el medio completo se cambió a medio deprivado de esteroides y se incubó con: **A.** DHT (10 nM, 36 h) ($n=6$) ($****p < 0.0001$ vs. LNCaP (vector vacío) +DHT). **B.** 20-HETE (0.1 nM 36 h), 19-HEDE (10 μ M) o una combinación de ambos. ($n=6$) ($****p < 0.0001$ vs. vector vacío; $##p < 0.01$ vs. 20-HETE solo). **C.** 20-HETE (0.1 nM, 36 h) y/o 19-HEDE (10 μ M) y/o DHT (10 nM). ($n=6$, $****p < 0.0001$ vs. PSA-Luc; $####p < 0.0001$ vs. DHT solo; $++++p < 0.0001$ vs. 20-HETE+DHT). Los datos se presentan en unidades de luminiscencia relativa. Los valores se expresan como la media \pm SEM

2.2.3.2. Determinación de PSA

A efectos de confirmar los resultados del ensayo del gen reportero, que sugieren que el 20-HETE incrementa la actividad transcripcional del RA, se evaluó el efecto del 20-HETE sobre la liberación de PSA (proteína) al medio de cultivo. El estímulo con DHT (10 nM, 36 h) en medio deprivado de esteroides, usado como control positivo, aumentó la secreción de PSA al medio en un 740 ± 65 % ($p < 0.001$ vs. control). **Figura 16 Panel A.** El estímulo de las células con 20-HETE (0.1 nM, 36 h) resultó en un aumento más discreto, pero estadísticamente significativo del 58 ± 11 % ($p < 0.05$ vs. control) de PSA secretado, siendo este efecto revertido por la coincubación con 19-HEDE 10 μ M ($p < 0.01$ vs. 20-HETE solo). **Figura 16 Panel B.**

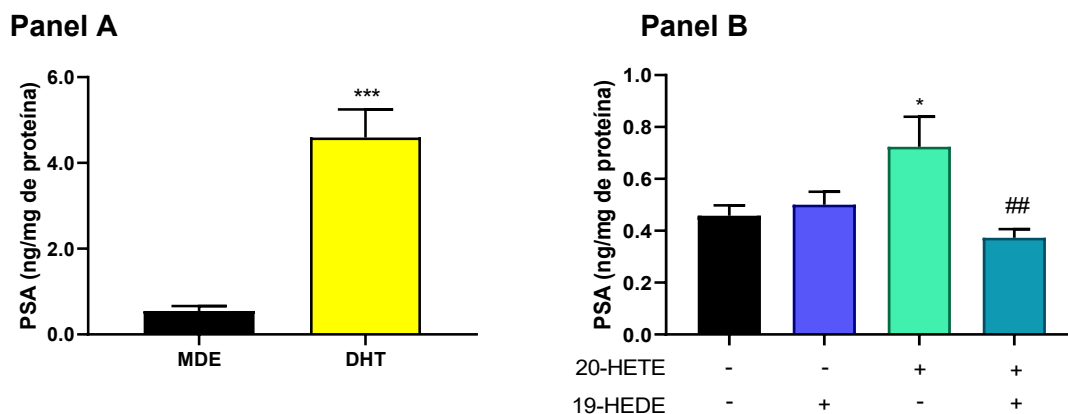


Figura 16. Efecto del 20-HETE sobre la secreción de PSA. Las células LNCaP fueron cultivadas en medio deprivado de esteroides (MDE) 24 h antes del estímulo con: **A.** DHT (10 nM, 36 h) ($n=3$, *** $p < 0.001$ vs. MDE). **B.** 20-HETE (0.1 nM, 36 h) y/o 19-HEDE (10 μ M). Control (vehículo) . ($n=3$, * $p < 0.05$ vs. control; ## $p < 0.01$ vs. 20-HETE solo). Los datos se presentan como ng de PSA por mg de proteína en la monocapa. Los valores se expresan como la media \pm SEM

3. CÉLULAS NO SENSIBLES A LOS ANDRÓGENOS (PC-3)

3.1. Efecto del 20-HETE sobre la expresión del receptor GPR75

A fin de evaluar la regulación de la expresión del receptor GPR75 de forma independiente a los andrógenos, se utilizó la línea celular de cáncer de próstata no sensible a los andrógenos, PC-3.

La **Figura 17** muestra que, de forma similar a lo observado en las células LNCaP, el agonista 20-HETE (0.1 nM, 12 h) disminuyó en un $81\pm 6.7\%$ la abundancia del receptor GPR75 ($p < 0.0001$ vs. control), y este efecto fue revertido por la presencia del antagonista AAA (5 μM) ($p < 0.01$ vs. 20-HETE solo). Más aún, el antagonista aumentó *per se* la expresión del receptor en un $32\pm 16\%$ ($p < 0.01$ vs. control).

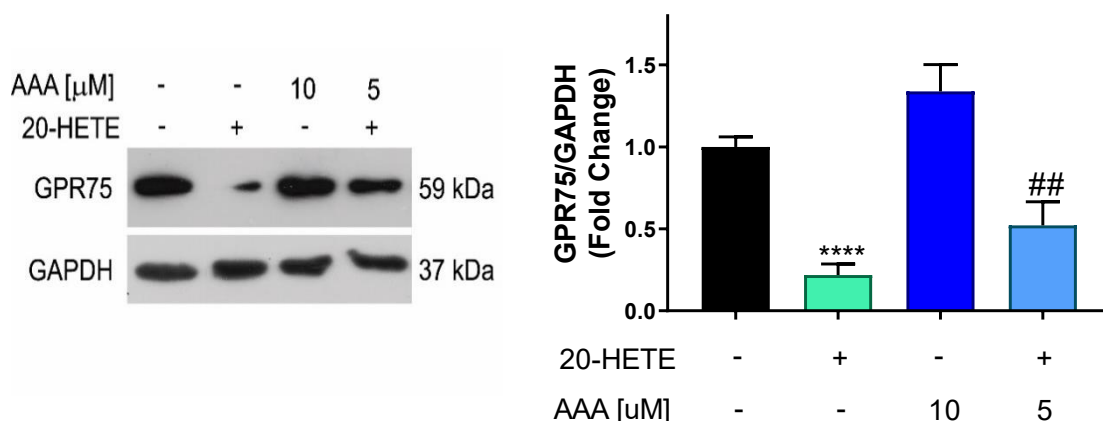


Figura 17. Efecto del 20-HETE sobre la expresión del receptor GPR75 en células PC-3. Las células fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 12 h), el antagonista aspartato de sodio ((6Z, 15Z)-20-hidroxi-eicosa-6,15-dienol) (AAA, 5 o 10 μM), o una combinación de ambos. Western Blot representativo de la expresión del receptor GPR75 en homogenatos celulares. El GAPDH se usó como control de carga. La cuantificación se presenta como la relación GPR75/GAPDH. Los valores se expresan como veces de cambio (Fold change) respecto al control (vehículo) y se representan como la media \pm SEM. (n=3, **** $p < 0.0001$ vs. control; # $p < 0.01$ vs. 20-HETE).

3.2. Señales intracelulares activadas por el 20-HETE en células PC-3. Rol del receptor GPR75

En las células PC-3, a diferencia de las LNCaP, las señales de proliferación y supervivencia no están bajo el control del RA. Por ese motivo, se estudió si en estas células el sistema 20-HETE/GPR75 modula señales previamente relacionadas a la transformación de las células a un fenotipo más agresivo.

3.2.1. Sobreexpresión de HIC-5

Una de las proteínas reportadas en relación con el receptor GPR75 por Garcia *et. al.* es HIC-5, que forma parte de la familia de la paxilina, está asociada a la adhesión focal, polimerización del citoesqueleto y a la migración celular, además de formar parte de la regulación transcripcional de varios genes ^{41,120}.

La expresión basal de HIC-5 aumentó en un 150 ± 40 % en presencia de 20-HETE (0.1 nM, 12 h) en células cultivadas en medio deprivado de suero ($p < 0.0001$ vs. control) (**Figura 18 Panel A**), siendo esta respuesta similar a la obtenida con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , 5 y 10 μ M) ($p < 0.0001$ vs. control), que fue utilizado como control positivo. **Figura 18 Panel B**. La coincubación con AAA (5 y 10 μ M) revirtió el efecto del 20-HETE ($p < 0.0001$ para AAA 5 y 10 μ M vs. 20-HETE). **Figura 18 Panel A**.

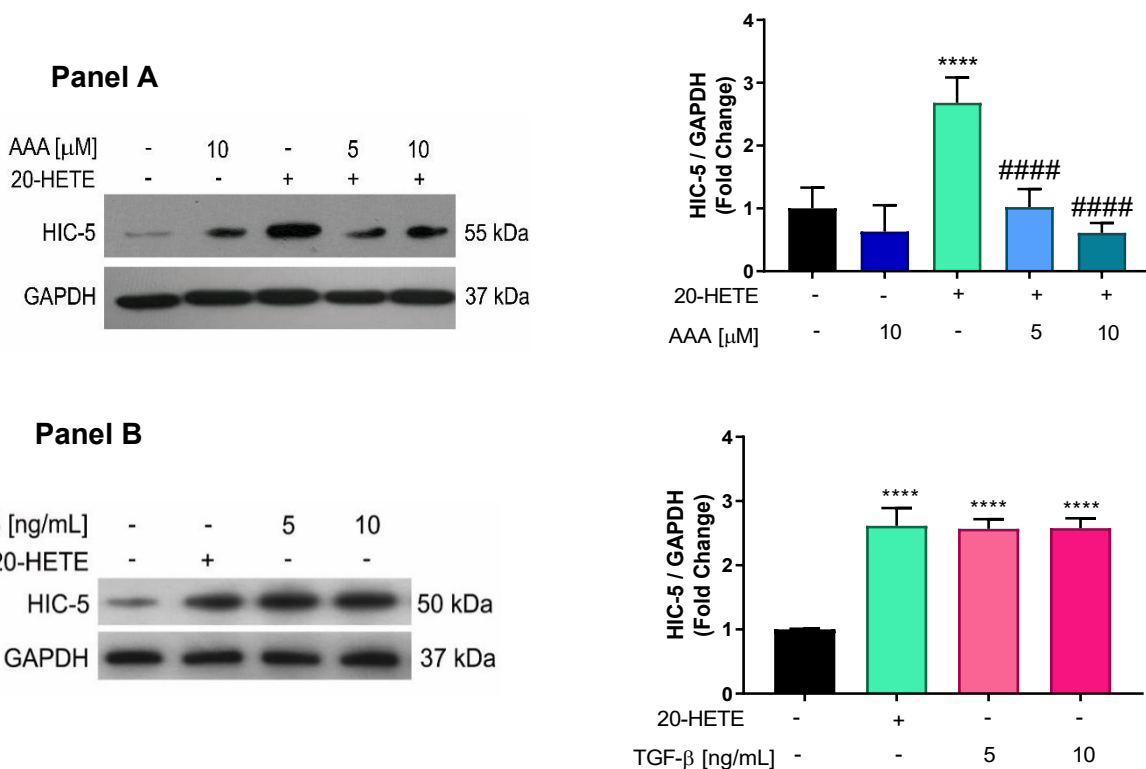


Figura 18. Efecto del 20-HETE sobre la expresión de HIC-5. Las células PC-3 fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 12 hs) y/o: **A.** AAA (5 o 10 μ M), o **B.** TGF- β (5 o 10 ng/mL). Western Blot representativo de la expresión de HIC-5 en homogenatos celulares. El GAPDH se usó como control de carga. La cuantificación se presenta como la relación HIC-5/GAPDH. Los valores se expresan como veces de cambio (Fold change) respecto al control (vehículo) y se representan como la media \pm SEM. (n=3, ****p<0.0001 vs. control; #####p<0.0001 vs. 20-HETE).

3.2.2. Activación de cascadas de señalización oncogénicas por el 20-HETE

En este punto se evaluaron las principales cascadas de señalización activadas por el 20-HETE en otros modelos experimentales, y que fueran conocidas por sus acciones oncogénicas.

El estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 2 h) incrementó la fosforilación de EGFR (Tyr 1092), NF- κ B (Ser 536) y Akt (Ser 473) en 146 \pm 66, 172 \pm 92 y 219 \pm 107 % respectivamente (p<0.01 para NF- κ B, y p<0.001 para EGFR y AKT vs. control), sin un aumento de la expresión de proteína total. **Figura 19 Panel A-C.** La magnitud de la respuesta al 20-HETE fue comparada con la respuesta obtenida por activadores conocidos de cada una de las señales estudiadas, utilizadas como control positivo. **Figura 19 Panel E-G.** La presencia del antagonista del receptor GPR75 (AAA 10 μ M) disminuyó significativamente el efecto del 20-HETE sobre la fosforilación de las moléculas en estudio (p<0.05 para NF- κ B, p<0.01 para AKT y p<0.001 para EGFR respectivamente vs. 20-HETE).

Por otro lado, la presencia de 20-HETE (0.1 nM, 2 h) no aumentó la fosforilación de p-38 (Tyr 182), siendo en cambio ésta incrementada en un 248 % ante el agregado de AAA (10 μ M) (p<0.0001 vs. control). Además, la coincubación con 20-HETE resultó en un aumento de la fosforilación de p-38 dependiente de la concentración de AAA (p<0.001 y p<0.0001 para 5 y 10 μ M vs. 20-HETE respectivamente). **Figura 19 Panel D.**

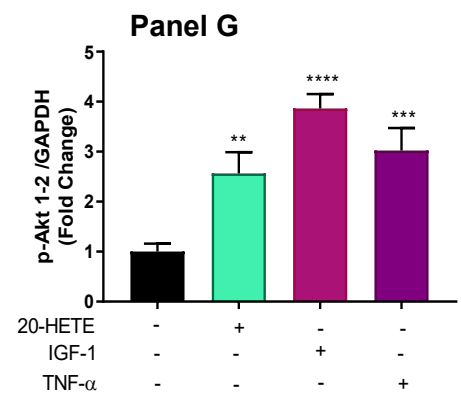
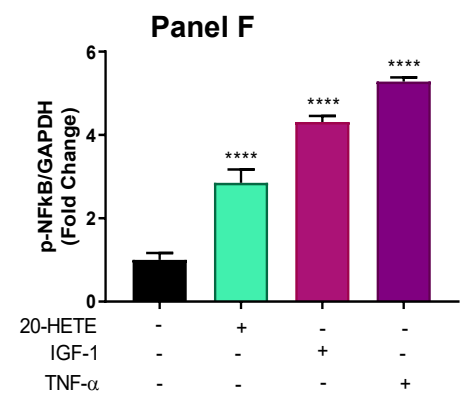
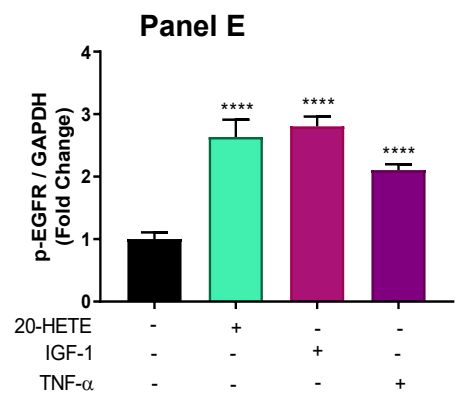
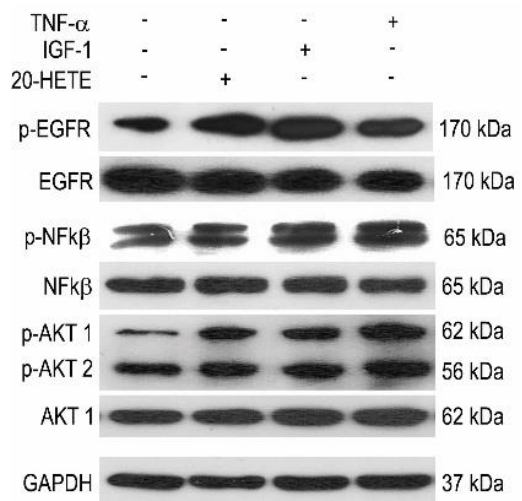
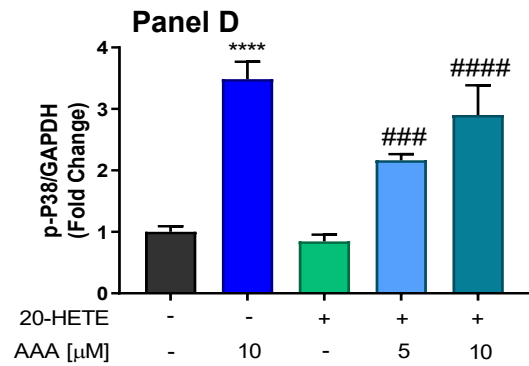
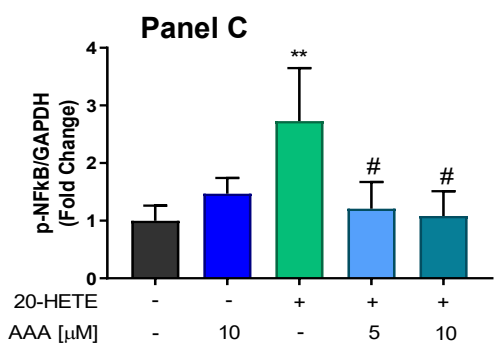
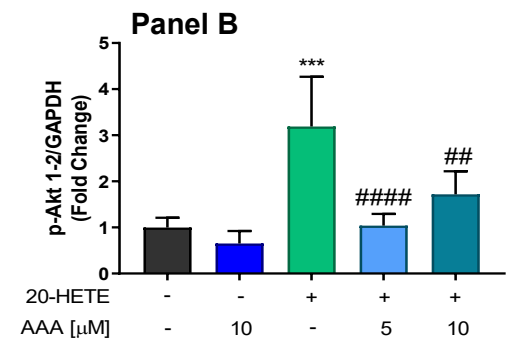
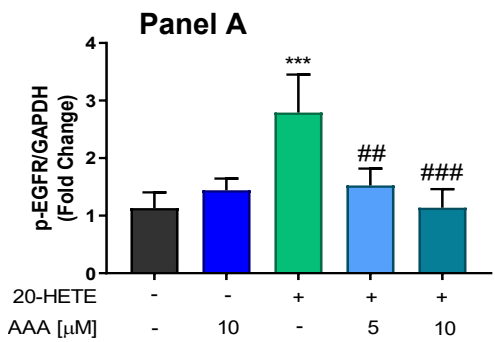
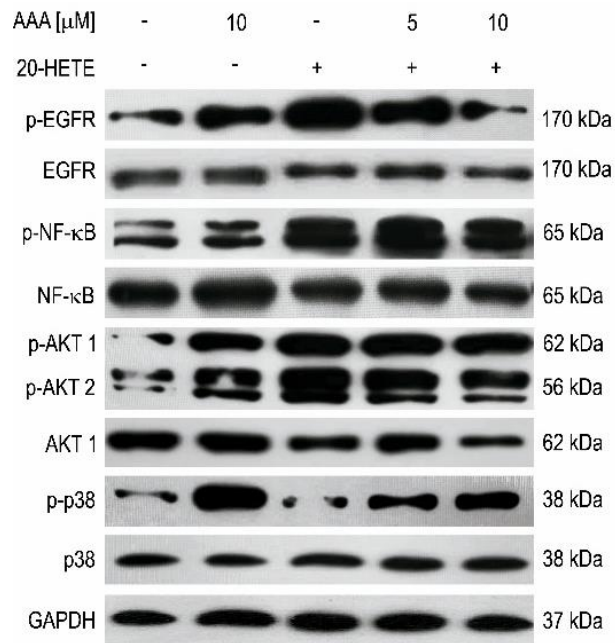
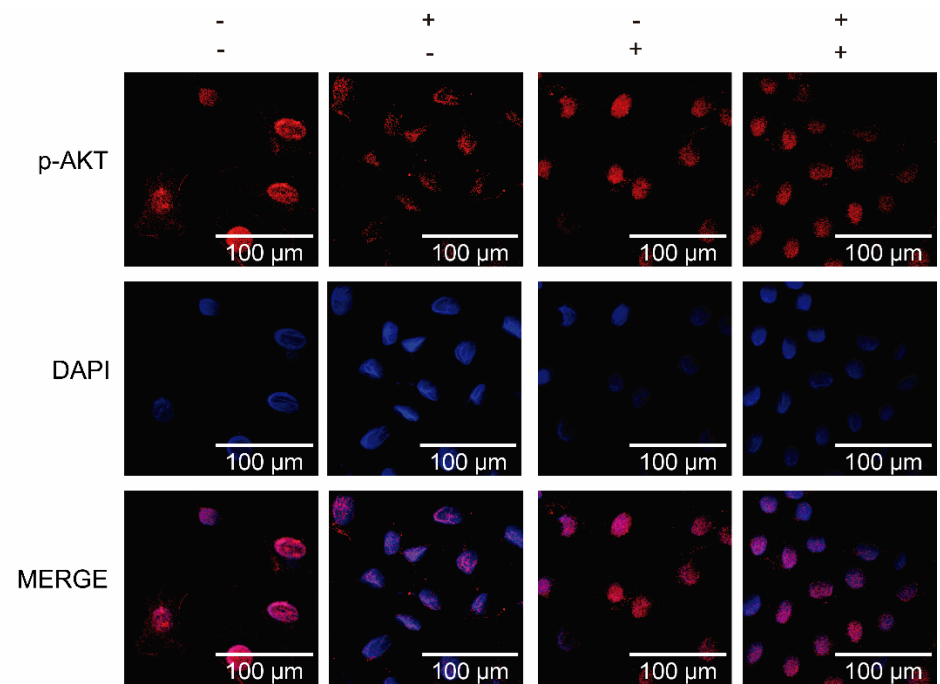
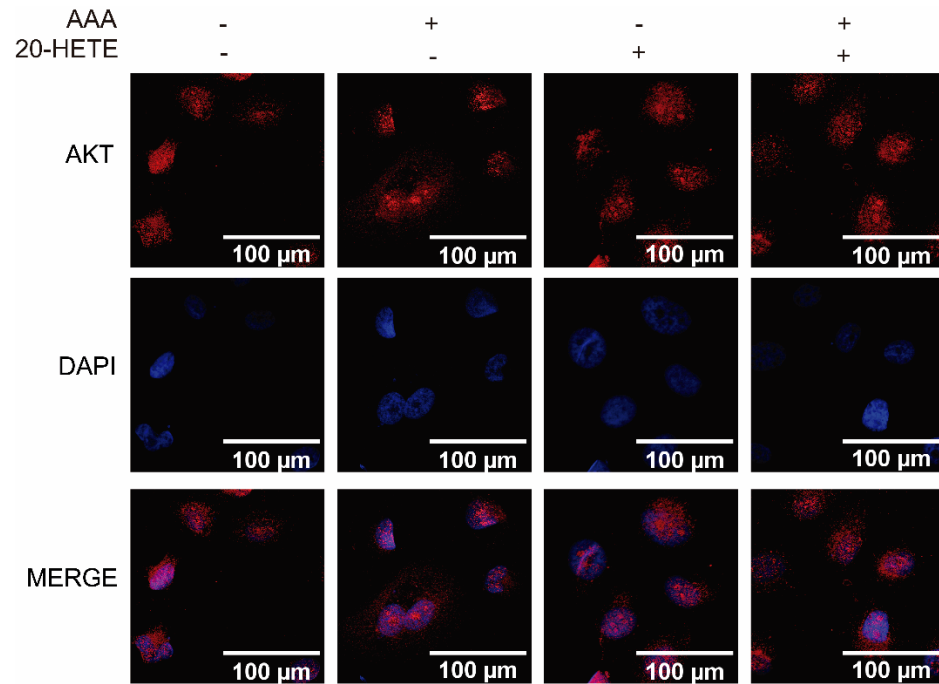


Figura 19. Fosforilación de proteínas. Las células PC-3 fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 2 h) y/o **A-D.** AAA (5 o 10 μ M), o **E-G.** IGF-1 (100 nM) o TNF- α (10 ng/mL). Anticuerpos específicos contra p-EGFR (Tyr 1092), p-NF- κ B p65 (Ser 536), p-AKT (p-AKT1 y p-AKT2) (Ser 473). Un Western Blot representativo de homogenatos celulares se presenta para cada caso. El GAPDH se usó como control de carga. La cuantificación se presenta como la relación p-proteína/GAPDH. Los valores se expresan como veces de cambio (Fold change) respecto al control (vehículo) y se representan como la media \pm SEM. (n=3, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. control; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 vs. 20-HETE)

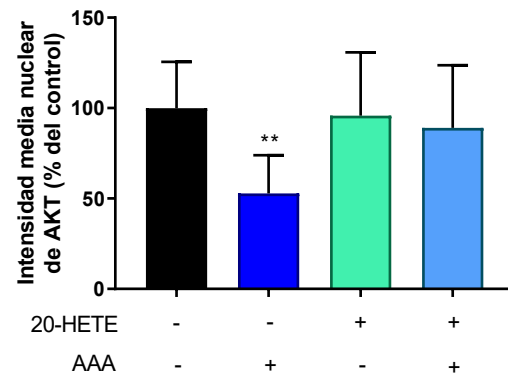
Partiendo de la premisa de que la fosforilación de las diferentes proteínas puede inducir la translocación de éstas a diferentes compartimentos de la célula, se evaluó por microscopía confocal el efecto del 20-HETE sobre la distribución intracelular de p-AKT, AKT, NF- κ B y PKC α .

El 20-HETE (0.1 nM, 1 h) aumentó selectivamente la presencia en el núcleo de p-Akt (p<0.001 vs. control), pero no de la proteína total (AKT). La coincubación con el antagonista AAA (5 μ M) atenuó el efecto observado sobre p-AKT (p<0.01 vs. 20-HETE). Más aún, la presencia del antagonista sólo, resultó en la redistribución desde el núcleo tanto de AKT como de p-Akt (p<0.01, p<0.001 vs. control, respectivamente). **Figura 20 Panel A y B.**

Por otro lado, respecto del NF- κ B, el 20-HETE no modificó la abundancia de esta proteína en el núcleo. En cambio, cabe recalcar que el antagonista *per se* promovió la redistribución del NF- κ B desde el núcleo (p<0.001 vs. control). **Figura 21.**



Panel A



Panel B

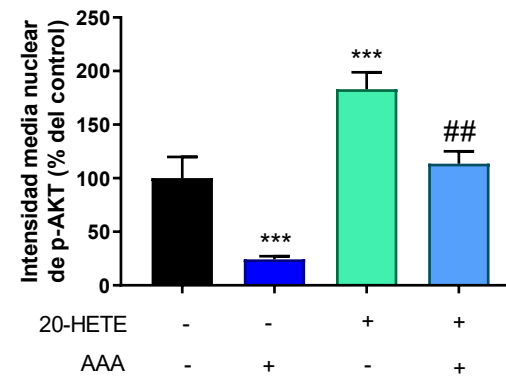


Figura 20. Redistribución celular de AKT y p-AKT. Las células PC-3 fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con **(A-B)** 20-HETE (0.1 nM, 2 h) y AAA (5 μ M) o una combinación de ambos. Se presentan microfotografías de inmunofluorescencia representativas **A.** AKT, **B.** p-AKT (Ser 473). La cuantificación se presenta como intensidad media nuclear de la proteína, normalizada al control (vehículo). Los valores se expresan como % del control y se representan como la media \pm SEM. (n=9-12, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control; ##p<0.01 vs. 20-HETE)

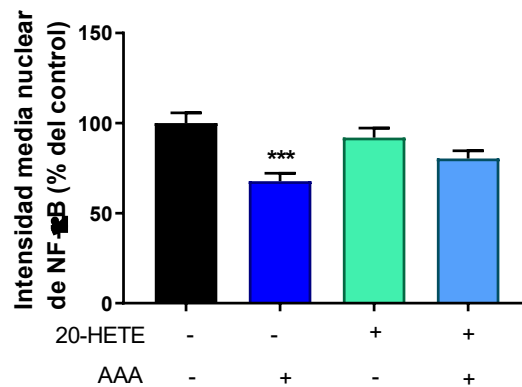
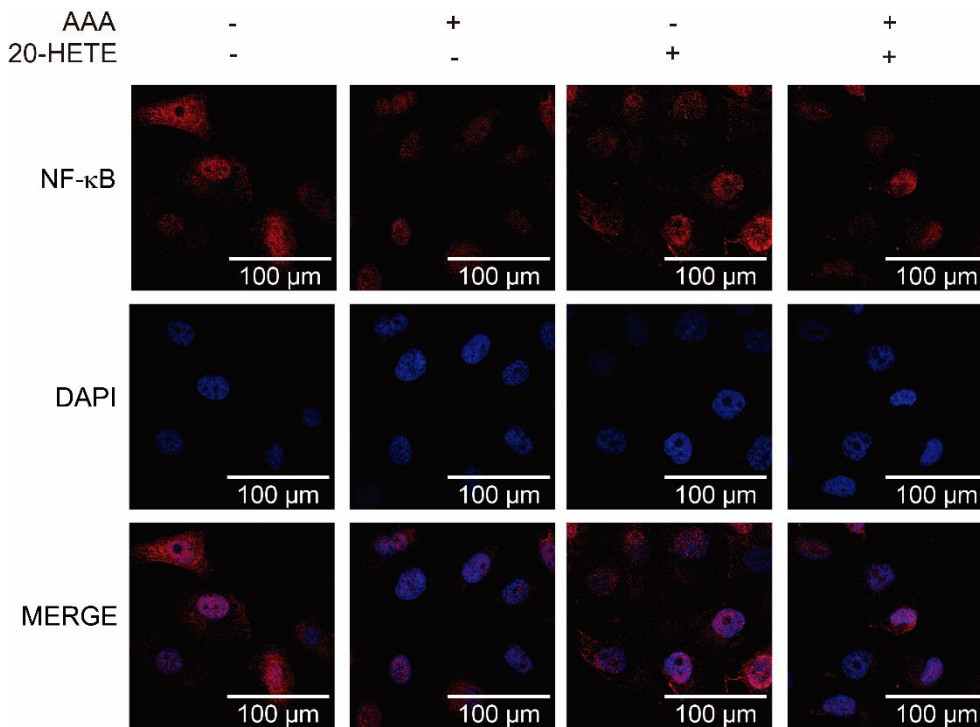
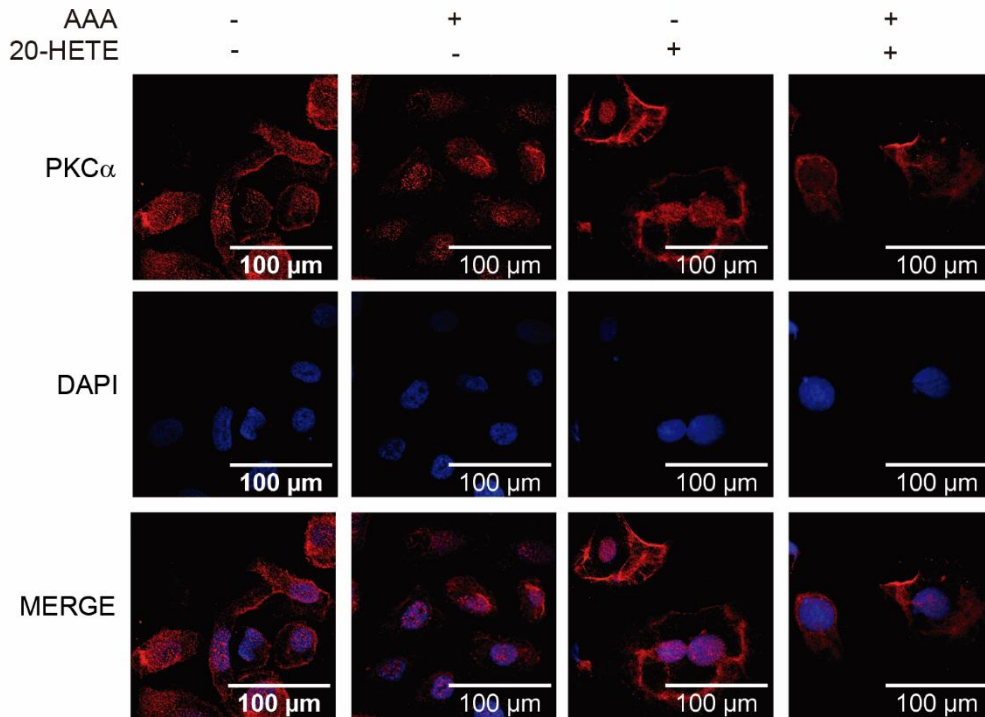
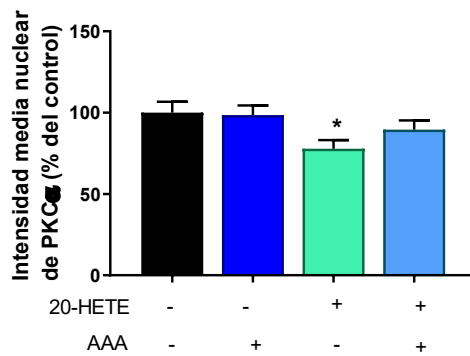


Figura 21. Redistribución celular de NF- κ B. Las células fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 1 h), AAA (5 μ M) o una combinación de ambos. Se presentan microfotografías de inmunofluorescencia representativas de NF- κ B. La cuantificación se presenta como intensidad media nuclear de la proteína, normalizada al control (vehículo). Los valores se expresan como la media \pm SEM. (n=3-12, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control).

Finalmente, el 20-HETE (0.1 nM, 10 min) indujo una redistribución de la PKC α desde el núcleo que resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$ vs control). Más aún, las imágenes sugerían que el 20-HETE promovió la redistribución de la PKC α a la membrana celular, siendo este fenómeno revertido por el AAA (5 μ M). **Figura 22 Panel A.** Esto fue confirmado por fraccionamiento subcelular, que permitió corroborar que en estado basal la PKC α se encuentra predominantemente en el citoplasma, y frente al estímulo con 20-HETE, transloca parcialmente a la fracción de membrana ($p < 0.01$ vs. control), efecto disminuido por el AAA (5 μ M) ($p < 0.05$ vs. 20-HETE). **Figura 22 Panel B.**



Panel A



Panel B

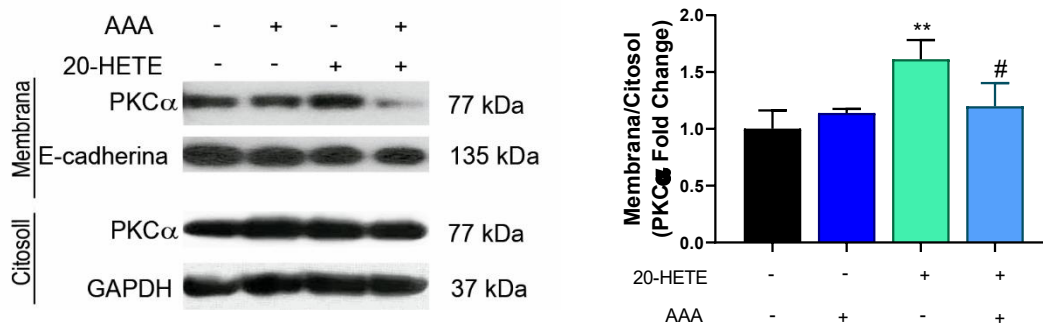


Figura 22. Redistribución celular PKC- α . Las células fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 10 min) y AAA (5 μ M) o una combinación de ambos. Se presentan microfotografías de inmunofluorescencia representativas. **A.** La cuantificación se presenta como intensidad media nuclear de la proteína, normalizados al control (vehículo). **B.** Western Blot representativo de la translocación de PKC α . El GAPDH y la E-Cadherina se usaron como control de carga. La cuantificación se presenta como el coeficiente PKC α /GAPDH para citosol y PKC α /E-cadherina para membrana. Los valores se expresan como veces de cambio (Fold change) respecto al control (vehículo) y se representan como la media \pm SEM. (n=3-12, *p<0.05, **p<0.01 vs. control; #p<0.05 vs. 20-HETE)

3.3. Acciones del 20-HETE sobre las características asociadas a la capacidad metastásica in vitro en células PC-3. Rol del receptor GPR75.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron el papel del 20-HETE en la acentuación del fenotipo maligno de células PC-3¹²¹. El siguiente grupo de experimentos tuvo por objetivo dilucidar la participación del receptor GPR75 en dichos efectos.

3.3.1. Transición Epitelio-Mesenguimal (TEM) – Inmunodetección de e-cadherina y vimentina

Es bien conocido que la transformación a un fenotipo celular más agresivo va acompañada de la disminución de la expresión de e-cadherina asociado al aumento de vimentina (cita).

En condiciones controles, la expresión de e-cadherina y vimentina en células PC-3 resultó semejante. La incubación con 20-HETE (0.1 nM, 24 h) disminuyó en un 40 ± 13 % la expresión del marcador epitelial e-cadherina, ($p < 0.0001$ vs. control). De manera correspondiente, la expresión de vimentina aumentó en un 150 ± 33 % ($p < 0.0001$ vs. control). Ambos efectos fueron revertidos por el antagonista AAA, tanto con 5 como 10 μM (e-cadherina ($p < 0.05$ vs. 20-HETE para ambas concentraciones; vimentina $p < 0.001$ y $p < 0.0001$ vs. 20-HETE para AAA 5 y 10 μM respectivamente) (**Figura 23 Panel A**). La magnitud de la respuesta del 20-HETE fue similar a la obtenida con un conocido inductor de TEM, el $\text{TGF}\beta$. **Figura 23 Panel B**.

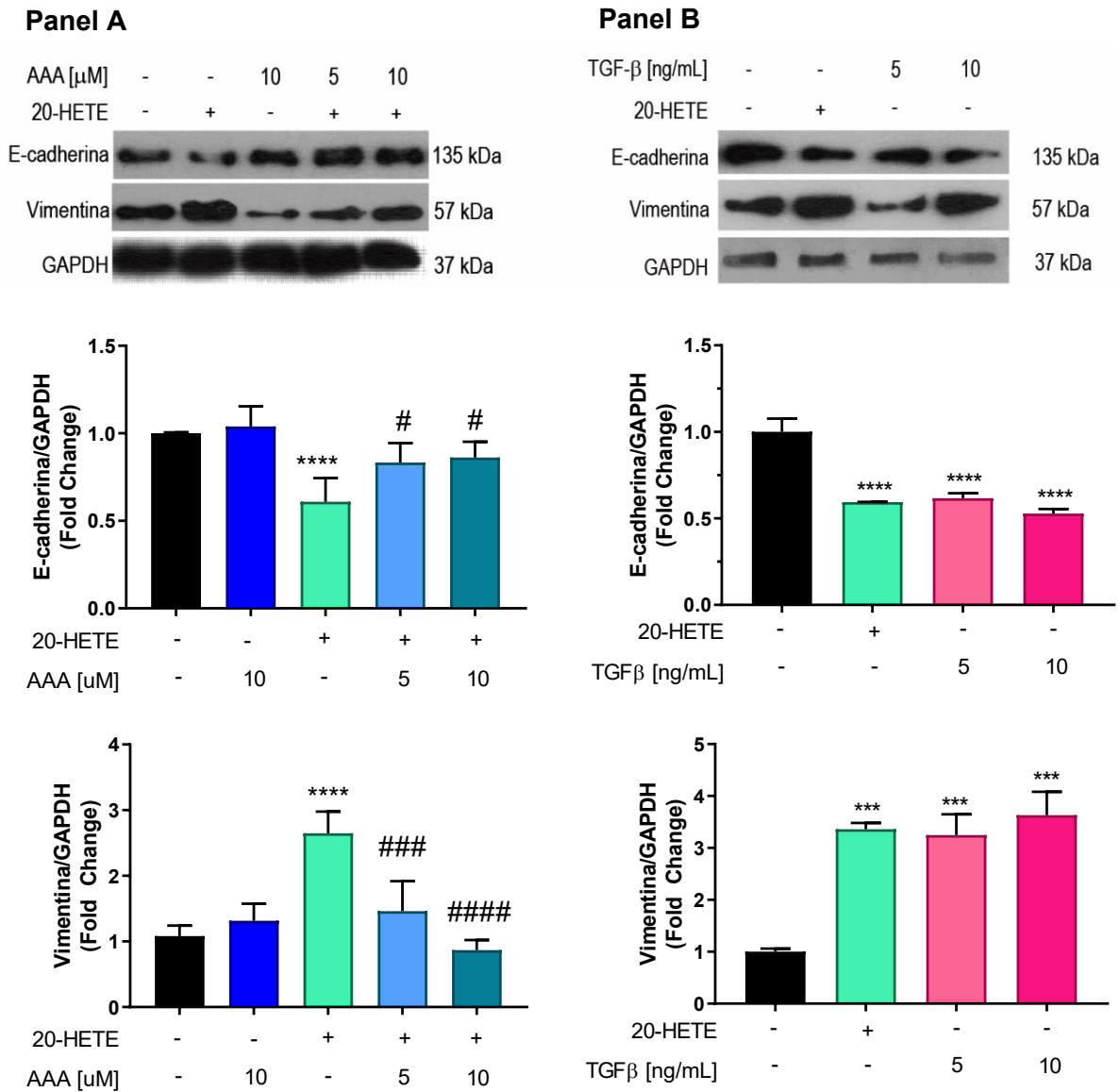


Figura 23. Marcadores de transición epitelio mesenquimal. Las células PC-3 fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 24 h) y/o **A.** AAA (5 o 10 μ M), o **B.** TGF- β (5 o 10 ng/mL). Western Blot representativo de la expresión de e-cadherina y vimentina en homogenatos celulares. El GAPDH se usó como control de carga. La cuantificación se presenta como la relación e-cadherina o vimentina/GAPDH. Los valores se expresan como veces de cambio (Fold change) respecto al control (vehículo) y se representan como la media \pm SEM. (n=3, ***p<0.001 ****p<0.0001 vs. control; #p<0.05 ###p<0.001 ####p<0.0001 vs. 20-HETE)

3.3.2. Actividad de Metaloproteasas de Matriz – Zimografía

En los siguientes experimentos se evaluó el efecto del 20-HETE sobre la actividad de la metaloproteasa de matriz-2 (MMP-2) en los medios condicionados de cultivos celulares utilizando la técnica de zimografía.

La incubación de las células con 20-HETE (0.1 nM, 24 h) aumentó en un 52 \pm 15 % la actividad de MMP-2 (p<0.05 vs control), y esta respuesta se vio atenuada por la coincubación con el antagonista AAA (5 y 10 μ M) en forma proporcional a su concentración (p<0.01 y p< 0.001 vs. 20-HETE respectivamente). **Figura 24.**

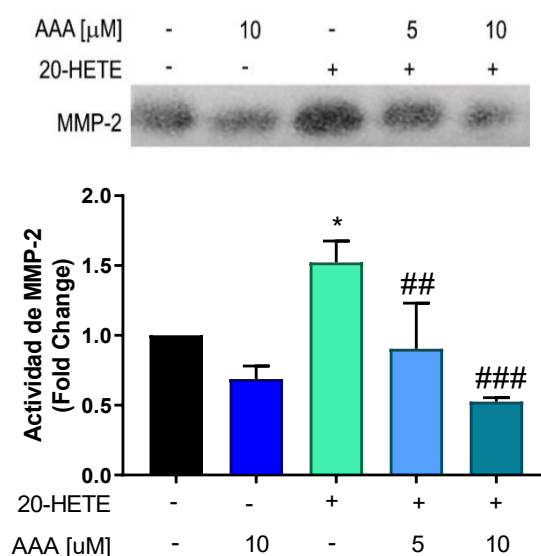


Figura 24. Actividad de MMP-2. Las células PC-3 fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 24 h) y/o AAA (5 o 10 μ M) y los medios condicionados fueron procesados. Se muestra una zimografía representativa. Los datos se expresan como veces de cambio (Fold Change) con respecto al control (vehículo) y los valores se presentan como la media \pm SEM. (n=3, *p<0.05 vs. control; ##p<0.01, ###p<0.001 vs. 20-HETE)

3.3.3. Reestructuración del citoesqueleto celular

Una vez liberada de la matriz celular, la célula requerirá una alteración en la dinámica del citoesqueleto celular que le permita movilizarse. La evaluación de los cambios en el citoesqueleto se realizó por microscopía de fluorescencia marcando las estructuras de α -tubulina con rodamina y los filamentos de F-actina con faloidina.

En condiciones control se observó una disposición filamentosa de la α -tubulina a través de todo el citoplasma celular, sin alteraciones visibles al microscopio luego del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 24 h), ni AAA (5 μ M, 24 h).

Para el caso de los filamentos de F-actina, en condiciones controles, se observaron estructuras fibrilares atravesando la célula y formando protrusiones pequeñas en el límite celular sobre la membrana. La presencia de 20-HETE (0.1 nM, 24 h) incrementó las fibras de estrés de F-actina al comparar con el control, la coincubación con AAA revirtió este efecto y conservó la marca de faloidina en la periferia de la membrana celular, semejante al control. **Figura 25 Panel A.**

La activación de la quinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) por fosforilación del residuo de tirosina 397 (Tyr 397) se asocia con la adhesión de la célula a la matriz extracelular y con la reorganización del citoesqueleto de actina y la polarización celular que facilita la migración e invasión ¹²².

Estímulos de 24 h con 20-HETE (0.1 nM) resultaron en un incremento en la fosforilación de FAK en el residuo Tyr397 en un 89 ± 0.4 % ($p < 0.0001$ vs. control) y esta activación fue disminuida en un 65 ± 9.7 % por la coincubación con AAA 10 μ M ($p < 0.001$ vs. 20-HETE). **Figura 25 Panel B.**

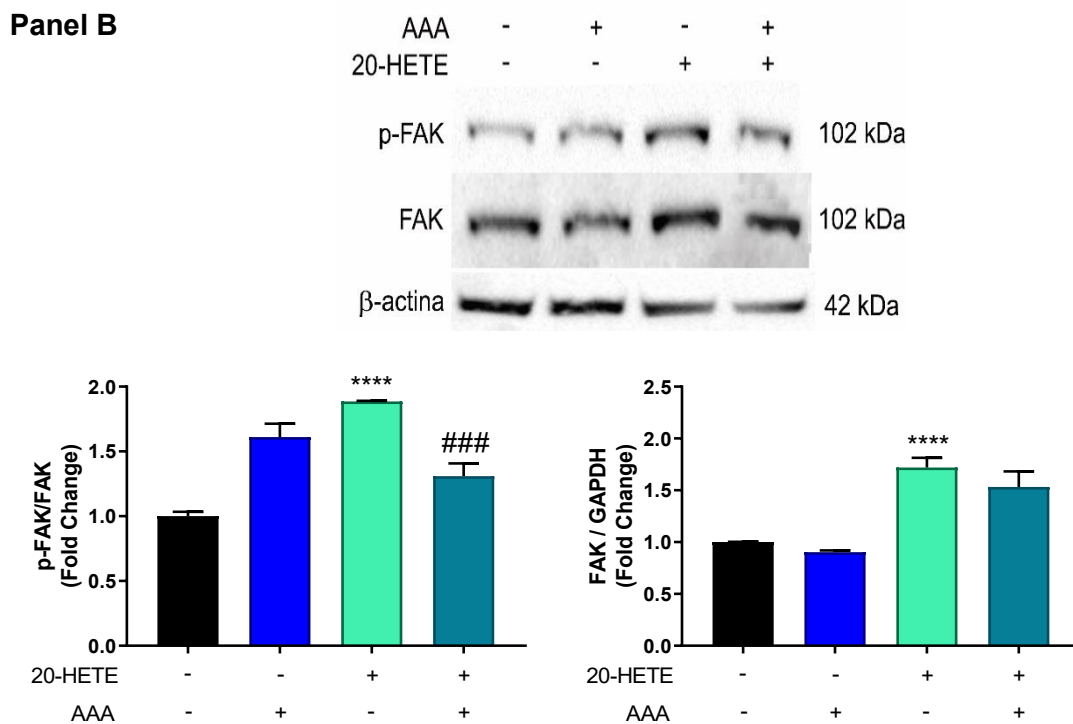
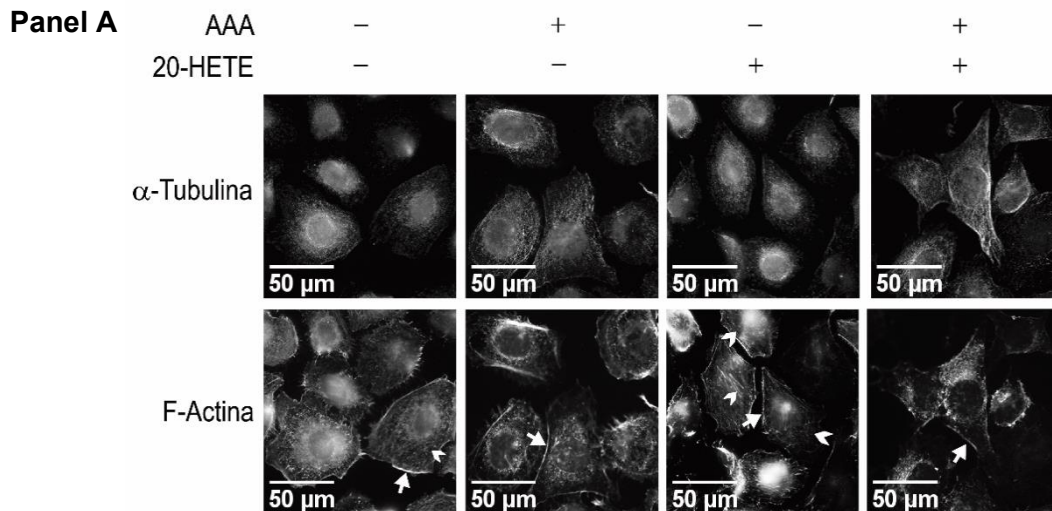


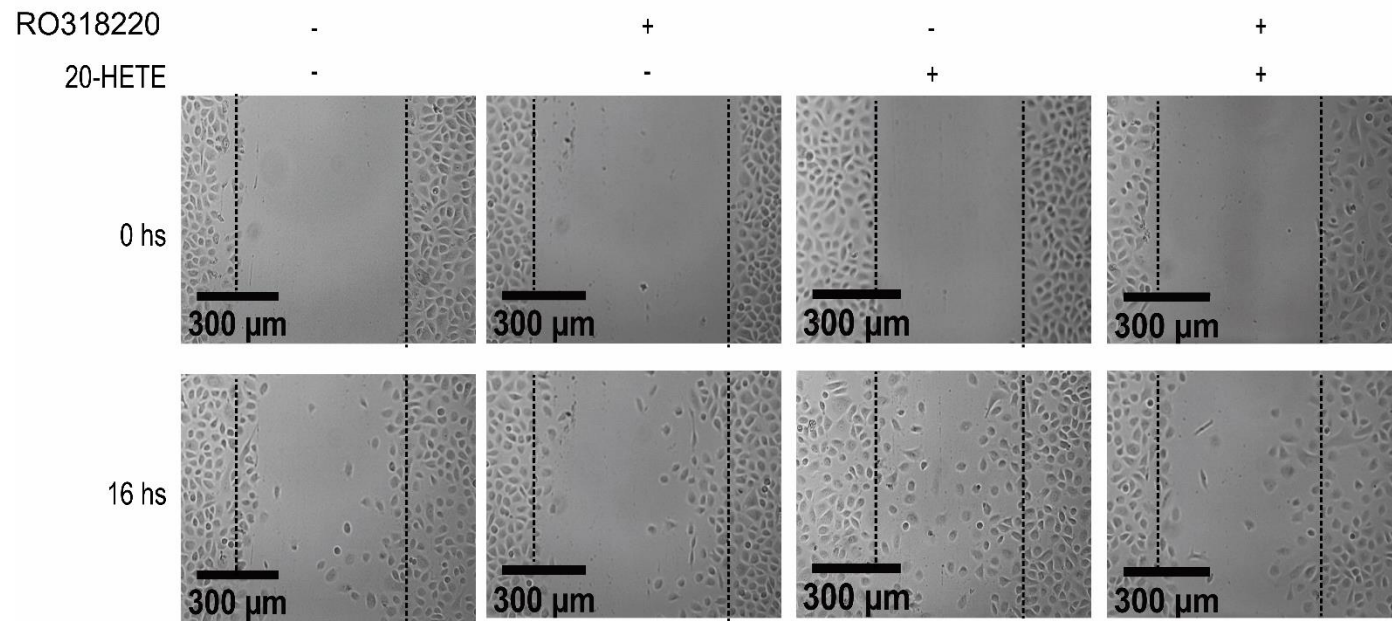
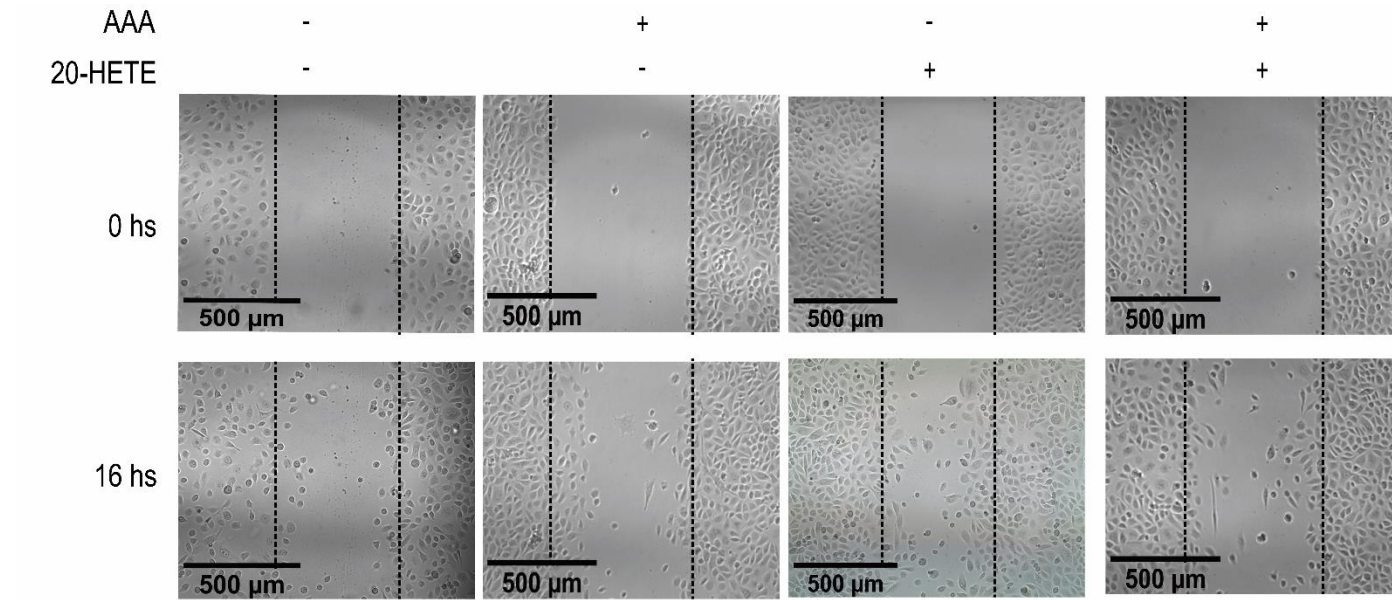
Figura 25. Reestructuración del citoesqueleto celular. Las células PC-3 fueron cultivadas en medio deprivado de suero durante 24 h antes del estímulo con 20-HETE (0.1 nM, 24 h) y/o AAA (10 μ M). **A.** Microfotografías representativas de la evaluación de α -tubulina (panel superior) y F-actina (panel inferior). Se evaluaron los cambios de las fibrillas de F-actina y se muestran con puntas de flecha las fibras de estrés y con flechas los sitios de adhesión focal. **B.** Western blot representativo de la expresión del p-FAK (Try 397) y FAK en homogenatos celulares. La expresión de p-FAK se muestra como la relación de p-FAK/FAK y la de FAK se muestra como FAK/ β -actina corrigi el grafico, dice GAPDH. Los valores se expresan como veces de cambio (Fold Change) respecto al control (vehículo) y se presentan como la media \pm SEM. (n=3****p<0.0001 vs. control; ###p<0.001 vs. 20-HETE).

3.3.4. Migración celular – Ensayo de cierre de herida

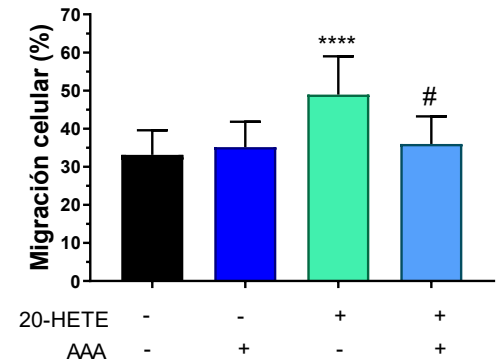
Para que la célula pueda invadir el tejido circundante debe tener una elevada capacidad migratoria. El ensayo de cierre de herida permite estimar *in-vitro* el cambio de la migración celular en respuesta a diferentes estímulos.

La incubación de células PC-3 con 20-HETE (0.1 nM, 16 h luego de realizada la herida) resultó en un aumento del porcentaje de migración del $48.9 \pm 2.7\%$ con respecto al control ($p < 0.0001$). La coincubación con AAA 5 μM disminuyó el efecto del 20-HETE al $36.0 \pm 2.9\%$ ($p < 0.05$ vs. 20-HETE solo). **Figura 26 Panel A.**

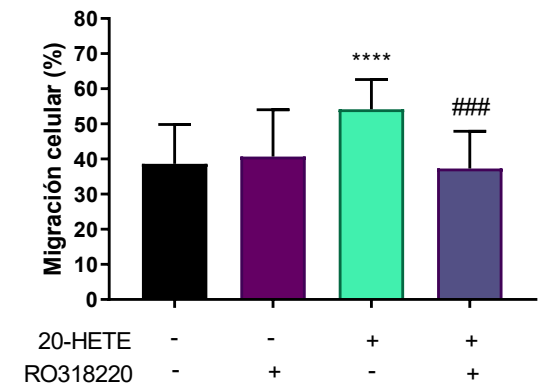
Además, se eligió este mismo modelo experimental para analizar la participación de las vías intracelulares activadas por el 20-HETE (descritas en el punto 3.2.2) en las respuestas celulares desencadenadas por el mismo. Las células se incubaron con 20-HETE (0.1 nM, 16 h) en presencia o ausencia de los siguientes inhibidores: PKC (RO318220, 100 nM) **Figura 26 Panel B**, PI3K/AKT (LY194002, 25 mM) **Figura 26 Panel C** y NF-kB (sulfasalazina, 500 mM) **Figura 26 Panel D**. Todos ellos redujeron significativamente la migración celular inducida por el 20-HETE (% Cierre de herida: 20-HETE solo $54.2 \pm 8.5\%$, $p < 0.0001$ vs. control; 20-HETE+RO318220, 37.3 ± 10.6 , $p < 0.001$ vs 20-HETE; 20-HETE+LY294002, 33.0 ± 9.3 , $p < 0.0001$ vs. 20-HETE; 20-HETE+sulfasalazina, 24.8 ± 7.5 , $p < 0.0001$ vs. 20-HETE). Más aun, la inhibición de PI3K/AKT y NF-kB disminuyó la migración celular *per se* ($p < 0.01$ y $p < 0.0001$ vs. control respectivamente). Estos resultados confirman que el estímulo de la migración celular inducido por el 20-HETE requiere de la participación de las cascadas de señalización intracelular activadas por el mismo.



Panel A



Panel B



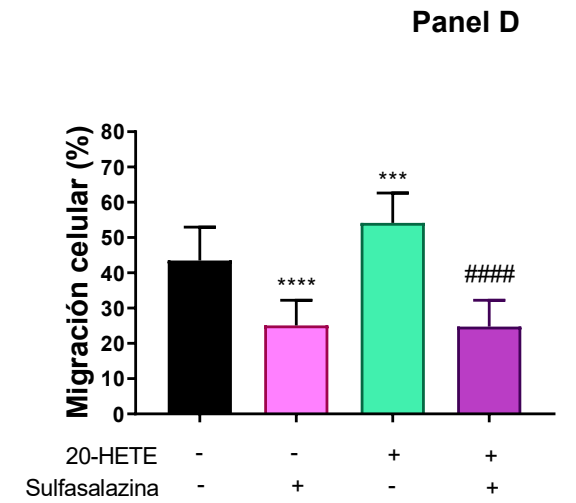
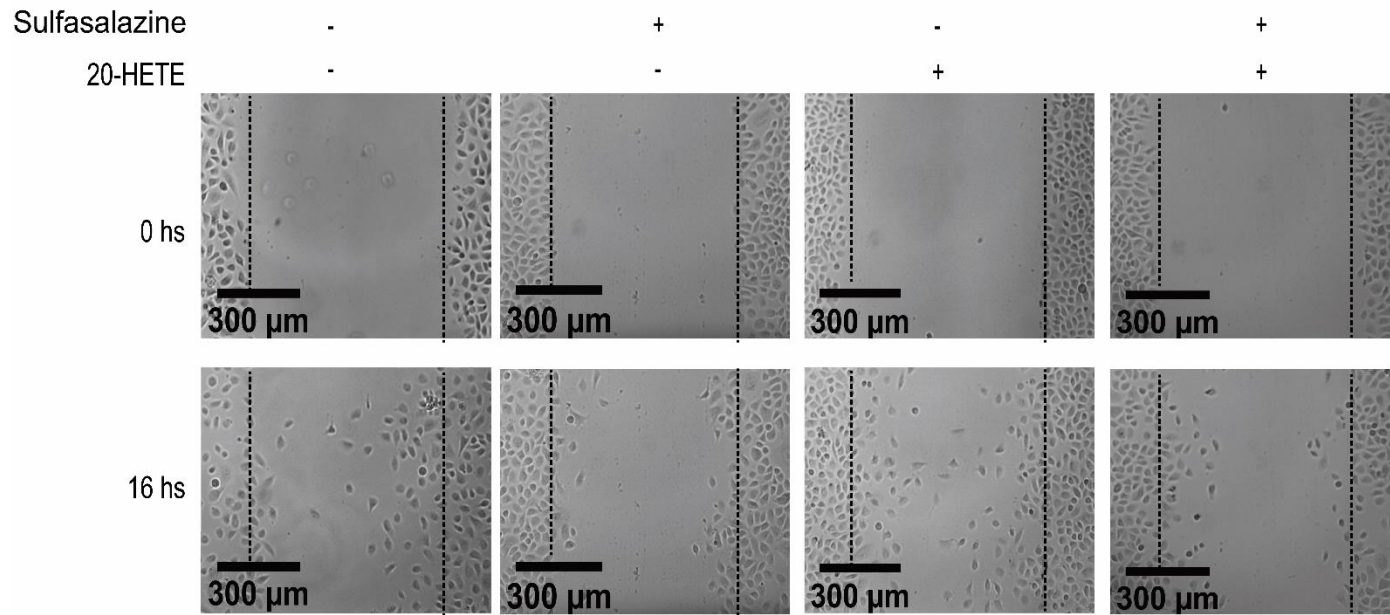
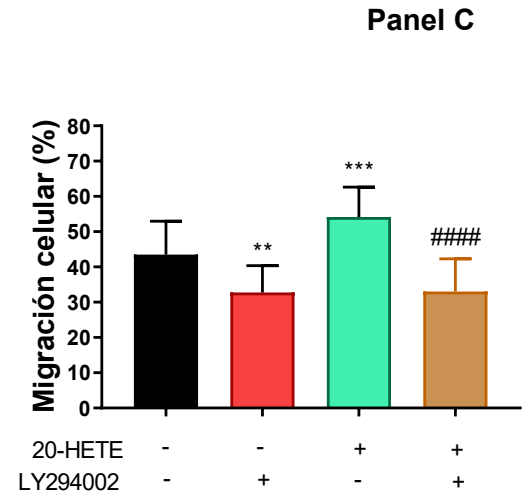
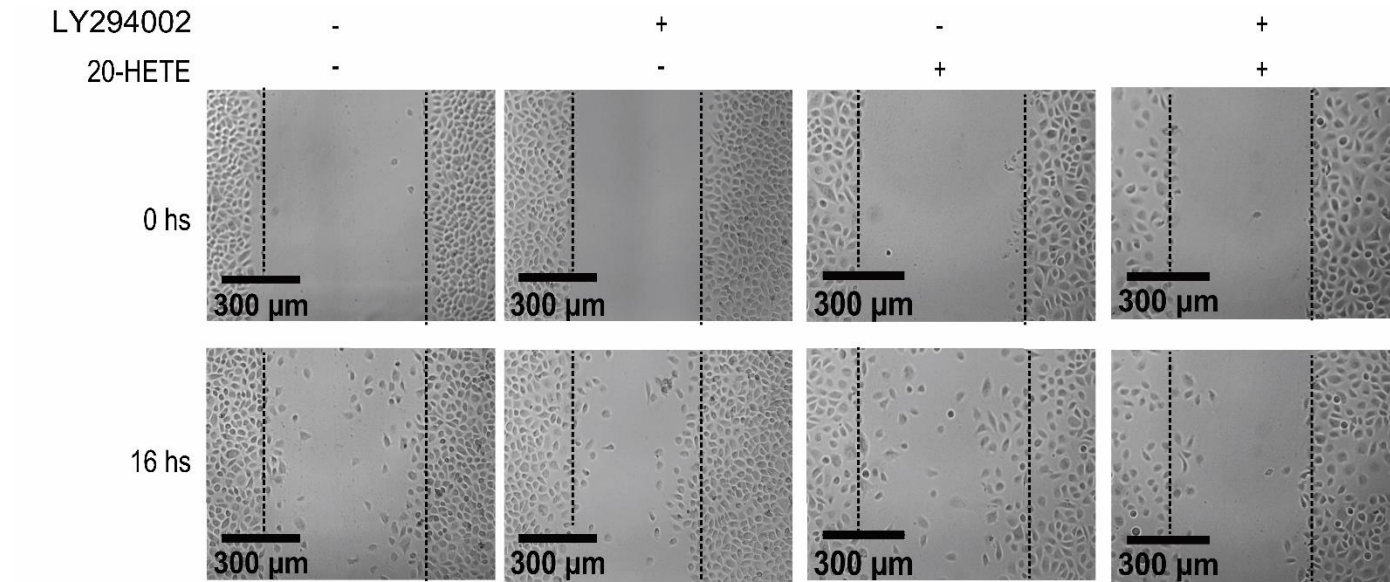


Figura 26. Migración celular. Las células se cultivaron en medio completo hasta alcanzar el 90-100% de confluencia, luego se mantuvieron en medio sin suero por 24 h previo a la realización de la herida (tiempo 0). Posteriormente se incubaron por 16 h con vehículo (control), 20-HETE (0.1 nM) y/o los siguientes inhibidores; **A.** AAA (5 μ M) (n=3), **B.** RO318220 (100 μ M, PKC) (n=3), **C.** LY294002 (25 μ M, PI3K/AKT) (n=3) y **D.** Sulfasalazina (500 μ M, NF- κ B) (n=3). Microfotografías representativas tomadas a tiempo 0 y 16 h después del estímulo en cada caso. La línea punteada negra marca la posición inicial. Los datos se presentan como % de migración celular luego de 16 h comparadas con el tiempo 0. Se analizaron de 9 a 12 fotografías por condición. Los valores se presentan como la media \pm SEM (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. control; #p<0.05, ###p<0.001, ####p<0.0001 vs. 20-HETE).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo contribuyen al conocimiento del papel que cumple el 20-HETE en la biología del cáncer de próstata y las diferentes acciones que desencadena, en forma dependiente o independiente de los andrógenos. Además, se ha abordado por primera vez importancia del receptor GPR75 en células tumorales.

Se demostró que ambas líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y PC-3) expresan el receptor GPR75, lo que sugiere que posiblemente estas células respondan al 20-HETE a través de este receptor como ha sido reportado en células del músculo liso³², hipótesis que fue confirmada por los resultados del presente trabajo.

Además, la sobreexpresión de este receptor cuando las células son sometidas a un medio empobrecido en nutrientes sugiere la importancia del GPR75 para la supervivencia de ambas líneas celulares.

Nuestro laboratorio demostró anteriormente que el estímulo androgénico aumenta la expresión del CYP4F2 (mRNA y proteína) así como la disponibilidad intracelular de 20-HETE en células LNCaP²⁴. En este contexto, es posible especular que la mayor expresión del receptor GPR75 en las células LNCaP respecto de las PC-3 responde a una activación constitutiva del eje CYP4F2-20-HETE-GPR75 dependiente de andrógenos, que no está activa en las células PC-3, no sensibles a andrógenos.

A su vez, la mayor sobreexpresión del receptor GPR75 en células PC-3 en un medio pobre en nutrientes, en comparación con la línea LNCaP en similares condiciones, podría sugerir que, si bien en estas últimas las vías activadas por este receptor constituyen un medio compensatorio para la supervivencia en condiciones adversas, estas señales cobran mayor importancia aún en células no sensibles a los andrógenos.

La concentración de 20-HETE utilizada en el presente trabajo (0.1 nM) se encuentra dentro del rango del Kd calculado para la unión del 20-HETE con el receptor GPR75 (3.75 nmol/L) ³². Además, otros autores demostraron que concentraciones similares de 20-HETE incrementan significativamente la fosforilación de I κ B α (Inhibidor de κ B, alfa) y MAPK-ERK 1/2 en células epiteliales ¹²³. Si bien pareciese que la cantidad de 20-HETE utilizada en el presente trabajo es inferior a la concentración intracelular del eicosanoide reportada para células LNCaP (312.8 \pm 62 ng/mg de proteína) y células PC-3 (207.3 \pm 9.0 ng/mg de proteína) ²⁴, se debe tomar en cuenta que estos valores corresponden a la concentración intracelular total del compuesto (20-HETE libre más esterificado). Es sabido que, una vez que la célula lo produce, este eicosanoide puede permanecer libre en el citoplasma o ser re esterificado y almacenado en fosfolípidos de membrana ²⁹.

Es conocido que, en presencia de su agonista, los GPCRs sufren el proceso de desensibilización. En efecto, una característica general de estos receptores es que poseen complejos mecanismos de regulación que modulan su capacidad de respuesta. Estos mecanismos pueden afectar a su expresión, a su funcionalidad y a su localización subcelular. Dos familias de proteínas desempeñan un papel clave en la modulación de la funcionalidad y la dinámica intracelular de receptores tras la activación por agonistas: la familia de quinasas de GPCR, denominadas GRK (G protein-coupled receptor kinases), y las proteínas desacoplantes denominadas arrestinas ¹²⁴. Las GRKs son una familia de quinasas de serina/treonina localizadas principalmente en el citoplasma celular y en la membrana plasmática. Una vez que el ligando se une a su GPCR, las GRKs fosforilan residuos de serina y treonina ubicados en el dominio carboxilo terminal intracelular del receptor ^{125,126}. Este sitio es reconocido entonces por la β -arrestina y permite su unión a la superficie citosólica del GPCR impidiendo la transducción de la señal desde aquél a las proteínas G heterotriméricas ^{127,128}. Las β -arrestinas pueden actuar como estructura de andamio o adaptador para otras proteínas, como la clatrina

o las proteínas adaptadoras de clatrina. El reclutamiento y polarización de la clatrina resulta en la invaginación de la membrana. Las vesículas formadas por clatrina (endosomas) contienen al GPCR desensibilizado, y pueden fusionarse con los lisosomas para la degradación del receptor, evitando que la célula responda al estímulo del ligando de manera exagerada ^{127,129–131}.

En este trabajo, la exposición de las células al 20-HETE disminuyó la expresión proteica total del receptor GPR75, sugiriendo la degradación del receptor para prevenir la respuesta celular desmedida al estímulo del mismo. Este comportamiento puede ser entendido como un mecanismo de defensa frente a la sobre activación del receptor que podría desencadenar una amplificación anormal de señales celulares, resultando en comportamientos fisiológicos anormales.

CÉLULAS SENSIBLES A ANDRÓGENOS (LNCaP)

En el cáncer de próstata, el RA juega un rol fundamental para el desarrollo de la enfermedad, promoviendo la proliferación y manteniendo la viabilidad celular ¹⁰⁷. Datos previos de nuestro laboratorio demostraron que la inhibición de la síntesis de 20-HETE disminuye la expresión del RA tanto a nivel del mRNA como de la proteína ²⁴. Por esta razón, era esperable la sobreexpresión del RA al incubar las células con 20-HETE; además, de nuestros resultados se desprende que esta respuesta depende del receptor GPR75. Si bien en este trabajo no se ha profundizado respecto del mecanismo comprometido, podríamos plantear la hipótesis de la participación de c-Src como nexo entre la activación de GPR75 y la mayor expresión del RA. Este planteo se basa en: 1) la activación del GPR75 en células del músculo liso promueve la activación de c-Src³², 2) la inhibición de c-Src disminuye la expresión del RA en células C4-2 (línea celular derivada de un tumor xenográfico de LNCaP) ¹³².

La vía genómica del RA depende de la capacidad de éste de translocar al núcleo celular donde actúa como factor de transcripción de proteínas que intervienen en la supervivencia y proliferación celular. Al unirse la DHT a la sección LBD del RA se produce un cambio conformacional que permite la dimerización del receptor y la translocación al núcleo ¹⁰⁷. En nuestras condiciones experimentales, confirmamos que la DHT, usada como control positivo, promueve la localización nuclear del RA, la transcripción del gen que codifica para el PSA (*KLK3*) y la liberación de PSA al medio. Las imágenes de microscopía confocal y los ensayos de gen reportero revelaron respuestas cualitativamente semejantes a las de la DHT ante la incubación de las células con 20-HETE en medio empobrecido en esteroides. La disminución del efecto de la DHT sobre la viabilidad celular ante la inhibición de la síntesis de 20-HETE ²⁴, junto a una respuesta del 20-HETE cualitativamente semejante a la de DHT, observada en el presente trabajo, sugieren que el 20-HETE sería una molécula clave dentro de las señales intracelulares en respuesta al estímulo androgénico. Si bien la translocación del RA al núcleo inducida por el 20-HETE resultó cuantitativamente semejante a la respuesta a la DHT, la magnitud del efecto sobre la actividad transcripcional del RA y la secreción del PSA al medio fue menor. Ello sugiere la participación de otros factores dependientes de la DHT en los eventos intranucleares que determinan la actividad transcripcional del RA.

Sin embargo, el resultado más relevante fue el efecto sinérgico entre el 20-HETE y la DHT a nivel de la actividad transcripcional del RA. Como se explicó en la introducción, la actividad del RA se mantiene en pacientes con TDA y los genes bajo regulación de este receptor se encuentran también activos ¹³³. De esta forma, durante el TDA el RA adquiere la capacidad de sostener su actividad transcripcional y así regular la proliferación celular y la progresión tumoral aún en condiciones de mínima disponibilidad de andrógenos. Esto conduce a la recaída bioquímica (aumento de los niveles de PSA en plasma, que suele acompañar la evolución hacia la forma más agresiva conocida

como CPRC. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos que sostienen la actividad transcripcional del RA en condiciones de privación hormonal resulta de vital importancia. Los resultados presentados en este trabajo sugieren la participación del eje 20-HETE/GPR75 en este proceso. Si bien nuestros datos no permiten aventurar sobre el mecanismo involucrado, podría especularse la participación, entre otros factores, de c-Src. Esta hipótesis se basa en: 1) la activación de c-Src en respuesta al estímulo de GPR75 propuesta por otros autores ³², y 2) c-Src media la fosforilación del RA en la tirosina 534 inducida por factores de crecimiento como el EGF o el factor de crecimiento insulínico -1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) que resulta en la translocación nuclear de este receptor y la transcripción de PSA, aun en ausencia de andrógenos ^{134,135}.

En resumen, toda esta información nos permite concluir que tanto la expresión, translocación y actividad transcripcional del RA se encuentran asociadas a la disponibilidad de 20-HETE, y que el eje 20-HETE/GPR75 desempeña un papel importante en la regulación de la actividad del RA y, eventualmente, en la progresión de la enfermedad a CRPC.

CÉLULAS NO SENSIBLES A ANDRÓGENOS (PC-3)

Los resultados de los experimentos con células PC-3 ratifican el importante papel del receptor GPR75 en células de cáncer de próstata no sensibles a andrógenos.

Respecto la activación de señales intracelulares por el 20-HETE, el presente estudio demuestra que el 20-HETE incrementó la expresión de HIC-5 de manera dependiente del GPR75. Otros autores ya habían demostrado que HIC-5 es una de las proteínas cuya activación es consecuencia del estímulo del receptor GPR75 en células del músculo liso ³².

Se han atribuido diversas acciones a HIC-5, tales como participar en la regulación transcripcional, la reorganización del citoesqueleto, y la movilidad celular ⁴¹. En efecto, la sobreexpresión de HIC-5 en líneas celulares tumorales probó ser suficiente para dirigir el cambio a una morfología mesenquimal y promover la plasticidad e invasión celular ¹²⁰.

La cascada de señalización que se inicia luego de la activación de un GPCR generalmente resulta en la amplificación de señales a través de la célula y, en determinadas condiciones, la hiperactivación de estos receptores puede terminar en un comportamiento celular anormal. De hecho, los GPCRs juegan un rol integral en la regulación y activación de las vías de señalización asociadas al cáncer, y pueden inducir cascadas de señalización como PI3K/AKT y la vía de las MAPK ¹³⁶. Además, dependiendo del receptor y el tipo celular, las vías de señalización de los GPCRs pueden involucrar la transactivación de diferentes receptores tirosina-quinasa (RTKs, por sus siglas en inglés), como el EGFR y el receptor serina/treonina quinasa ¹³⁷. Como se describirá más adelante, la relevancia de todas estas vías en cáncer es bien conocida. En este contexto, los presentes resultados mostraron que el 20-HETE activa las vías de EGFR, NF- κ B, AKT y PKC α a través del receptor GPR75. Si bien la activación de estas señales por el 20-HETE había sido descrita anteriormente en otros tipos celulares ^{38,138,139}, los resultados de esta tesis demuestran el rol de GPR75 en su activación en células de cáncer de próstata.

Si bien resultó sorprendente el aumento en la fosforilación de p-38 en respuesta al antagonista del receptor GPR75, y no al 20-HETE, este resultado puede ser comprendido a la luz del efecto de p-38 en otros modelos tumorales. En efecto, la activación de la vía de señalización de p-38 promueve la supresión de las funciones tumorales en células con características metastásicas a través de la restricción de la progresión del ciclo celular, promoviendo la senescencia y apoptosis ^{140,141}, todos estos efectos son opuestos a las acciones del 20-HETE.

Una de las principales finalidades de la señalización celular es el control de la expresión de genes en el núcleo. En esta línea de pensamiento se interpreta que el 20-HETE promovió el incremento de p-AKT en el núcleo, mientras que el antagonista del GPR75 disminuyó *per se* la señal nuclear del NF- κ B y AKT.

El incremento de la localización nuclear de moléculas de señalización ha sido descrito en diferentes tipos de cáncer. Se ha demostrado que AKT puede migrar al núcleo en respuesta a una variedad de estímulos incluyendo el IGF-1, la hipoglucemia, la insulina y el factor de crecimiento neuronal (NGF por sus siglas en inglés). Es más, algunos de los sustratos de AKT se encuentran permanentemente en el núcleo, como la familia de factores de transcripción FOXO o los co-activadores transcripcionales p300 ¹⁴². Además, la presencia de AKT fosforilada en el núcleo celular fue previamente descrita en células de cáncer de próstata ¹⁴³. En resumen, nuestros resultados sugieren que el estímulo basal del receptor GPR75 sostiene la localización nuclear de AKT y NF- κ B, y que la señal iniciada por el 20-HETE induce una mayor presencia de AKT fosforilado en el núcleo celular.

Para determinar la contribución de estas tres cascadas de señalización activadas por el 20-HETE (PI3K/AKT, NF- κ B, PKC α) al fenotipo celular maligno, se evaluó la capacidad migratoria de las células. Como se discutirá más adelante, el 20-HETE aumentó significativamente la migración celular, efecto que fue revertido por la inhibición de cada una de estas tres vías. Este resultado nos permite adjudicar un papel funcional a las vías de señalización activadas por el 20-HETE.

El rol oncogénico del eje PI3K/AKT va más allá de los efectos pro-proliferativos y de supervivencia celular e incluyen la migración e invasión celular ¹⁴⁴. AKT media la fosforilación del factor de transcripción TWIST1 que promueve la TEM y la metástasis en cáncer de mama ¹⁴⁵. NF- κ B contribuye al inicio de la tumorigénesis y al aumento de la capacidad invasiva regulando la transcripción de varios genes ¹⁴⁶. Además, la

activación de NF- κ B incrementa la TEM y la metástasis en modelos de cáncer de mama ¹⁴⁷, y promueve el crecimiento de metástasis en hueso del tumor primario de próstata ¹⁴⁸. Por su lado, PKC α se encuentra sobreexpresada en cáncer de próstata ¹⁴⁹, y su activación resulta en un incremento de la motilidad celular asociada a la invasión en varios modelos de cáncer *in vivo* e *in vitro* ¹⁵⁰.

Por ende, al ser el común activador de varias cascadas oncogénicas en células de cáncer de próstata, el eje 20-HETE/GPR75 puede ser considerado como un flanco atractivo para el desarrollo de agentes antitumorales.

La participación del sistema 20-HETE/GPR75 en varios procesos celulares que evidencian *in vitro* el potencial metastásico fue confirmado en los experimentos que se discuten a continuación.

La observación de que ambas proteínas marcadoras de TEM (e-cadherina y vimentina) fueron alteradas por la incubación con 20-HETE y que estos cambios fueron abolidos completamente por la presencia del antagonista del receptor, sugiere que el 20-HETE induce la TEM a través de la estimulación del receptor GPR75. También, el antagonismo de este receptor revirtió la migración celular, así como también la secreción de MMP-2 activa al medio condicionado promovidas por el 20-HETE. Estos resultados sustentan el rol del sistema 20-HETE/GPR75 en la activación de estos componentes claves de la metástasis tumoral.

La migración celular es un proceso dinámico que requiere del re-arreglo coordinado del citoesqueleto y la adhesión celular. Nuestros resultados muestran el rol del receptor GPR75 en la regulación de la estructura del citoesqueleto de actina, como así también en la fosforilación activante de FAK. Sin embargo, el hecho de que el aumento en la expresión total de FAK inducido por el 20-HETE no se viera afectado por el antagonista AAA, sugiere que este mecanismo es independiente del receptor GPR75. Otros autores han demostrado que la reorganización del citoesqueleto que se inicia por la unión de

ligandos a la actina produce no solamente la inhibición de la migración, sino también la apoptosis en células tumorales ^{151,152}. Por ello, tomando como base el rol de la actina en la transformación celular, la desorganización del citoesqueleto de actina ha sido propuesta como una potencial estrategia para terapias antitumorales ^{153,154}.

CONCLUSIÓN

Como se detalló en la introducción, la mayoría de los tumores prostáticos responden en un inicio a la terapia de privación de andrógenos, pero después de un tiempo progresan a un fenotipo más agresivo resistente a la castración. El tratamiento del cáncer de próstata independiente de los andrógenos es un reto clínico en la actualidad. Por lo tanto, se requiere del desarrollo de drogas dirigidas a blancos terapéuticos novedosos, diferentes a los atacados por las terapias antiandrogénicas convencionales¹⁵⁵. Este desafío requiere del conocimiento exhaustivo de los mecanismos que modifican diferentes vías de señalización intracelular, alterando los programas de transcripción génica, proliferación, diferenciación, migración, adhesión/movilidad, entre otros.

Así, los resultados del presente trabajo de tesis proveen evidencias sobre los mecanismos intracelulares comprometidos en las acciones protumorigénicas del 20-HETE en células de cáncer de próstata y demuestran que ellas requieren del estímulo del receptor GPR75. De esta manera, el antagonismo del receptor GPR75 podría ser considerado en el futuro como una interesante y novedosa diana terapéutica para el tratamiento de cáncer de próstata.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J Adv Res.* 2018;11:23-32. doi:10.1016/j.jare.2018.03.005
2. Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *J Adv Res.* 2018;11:33-41. doi:10.1016/j.jare.2017.11.004
3. Yagi S, Hara T, Ueno R, et al. Serum concentration of eicosapentaenoic acid is associated with cognitive function in patients with coronary artery disease. *Nutr J.* 2014;13(1):112. doi:10.1186/1475-2891-13-112
4. Murray RK, Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. *Harper. Bioquímica Ilustrada.*; 2016. doi:978-607-15-0304-6
5. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(4):639-649. Accessed January 23, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25343148>
6. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1612):20120431. doi:10.1098/rstb.2012.0431
7. Tang X, Chen S. Epigenetic Regulation of Cytochrome P450 Enzymes and Clinical Implication. *Curr Drug Metab.* 2015;16(2):86-96. doi:10.2174/138920021602150713114159
8. Johnson AL, Edson KZ, Totah RA, Rettie AE. Cytochrome P450 ω -Hydroxylases in Inflammation and Cancer. *Adv Pharmacol.* 2015;74:223-262. doi:10.1016/bs.apha.2015.05.002
9. Spector AA. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res.* 2009;50(SUPPL.). doi:10.1194/jlr.R800038-JLR200
10. Waldman M, Peterson SJ, Arad M, Hochhauser E. The role of 20-HETE in cardiovascular diseases and its risk factors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016;125:108-117. doi:10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2016.05.007
11. Roman RJ, Fan F. 20-HETE Hypertension and beyond. *Hypertension.* 2018;72(1):12-18. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10269
12. Edson KZ, Rettie AE. CYP4 enzymes as potential drug targets: focus on enzyme

- multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω -hydroxylase activities. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(12):1429-1440. Accessed February 1, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23688133>
13. Powell PK, Wolf I, Jin R, Lasker JM. Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285(3). Accessed August 28, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618440>
 14. Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res*. 2000;41(2):163-181.
 15. Lasker JM, Chen WB, Wolf I, Bloswick BP, Wilson PD, Powell PK. Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of Cyp4F2 and Cyp4A11. *J Biol Chem*. 2000;275(6):4118-4126. doi:10.1074/JBC.275.6.4118
 16. Christmas P, Jones JP, Patten CJ, et al. Alternative splicing determines the function of CYP4F3 by switching substrate specificity. *J Biol Chem*. 2001;276(41):38166-38172. doi:10.1074/jbc.M104818200
 17. Cui X, Nelson DR, Strobel HW. A Novel Human Cytochrome P450 4F Isoform (CYP4F11): cDNA Cloning, Expression, and Genomic Structural Characterization. *Genomics*. 2000;68(2):161-166. doi:10.1006/GENO.2000.6276
 18. Bylund J, Bylund M, Oliw EH. cDNA Cloning and Expression of CYP4F12, a Novel Human Cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(3):892-897. doi:10.1006/BBRC.2000.4191
 19. Nakagawa K, Marji JS, Schwartzman ML, Waterman MR, Capdevila JH. Androgen-mediated induction of the kidney arachidonate hydroxylases is associated with the development of hypertension. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2003;284(4):R1055-R1062. doi:10.1152/ajpregu.00459.2002
 20. Wu C-C, Mei S, Cheng J, et al. Androgen-Sensitive Hypertension Associates with Upregulated Vascular CYP4A12–20-HETE Synthase. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(8):1288-1296. doi:10.1681/ASN.2012070714
 21. Wu C-C, Cheng J, Zhang FF, et al. Androgen-Dependent Hypertension Is Mediated by 20-Hydroxy-5,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid–Induced Vascular

- Dysfunction. *Hypertension*. 2011;57(4):788-794.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.161570
22. Liu X, Wu J, Liu H, Lai G, Zhao Y. Disturbed ratio of renal 20-HETE/EETs is involved in androgen-induced hypertension in cytochrome P450 4F2 transgenic mice. *Gene*. 2012;505(2):352-359. doi:10.1016/J.GENE.2012.02.029
 23. Ding Y, Wu C-C, Garcia V, et al. 20-HETE induces remodeling of renal resistance arteries independent of blood pressure elevation in hypertension. *Am J Physiol Physiol*. 2013;305(5):F753-F763. doi:10.1152/ajprenal.00292.2013
 24. Colombero C, Papademetrio D, Sacca P, Mormandi E, Alvarez E, Nowicki S. Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (20-HETE) in Androgen-Mediated Cell Viability in Prostate Cancer Cells. *Horm Cancer*. 2017;8(4):243-256. doi:10.1007/s12672-017-0299-0
 25. Miyata N, Roman RJ. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res*. 2005;41(4):175-193. doi:10.1540/jsmr.41.175
 26. Rosolowsky M, Falck JR, Campbell WB. Metabolism of arachidonic acid by canine polymorphonuclear leukocytes synthesis of lipoxygenase and omega-oxidized metabolites. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab*. 1996;1300(2):143-150. doi:10.1016/0005-2760(95)00238-3
 27. Hill E, Murphy RC. Quantitation of 20-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid (20-HETE) produced by human polymorphonuclear leukocytes using electron capture ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*. 1992;21(5):249-253. doi:10.1002/bms.1200210505
 28. Chen L, Joseph G, Zhang FF, et al. 20-HETE contributes to ischemia-induced angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2016;83:57-65. doi:10.1016/j.vph.2016.04.002
 29. Carroll MA, Balazy M, Huang DD, Rybalova S, Falck JR, Mcgiff JC. Cytochrome P450-derived renal HETEs: Storage and release. *Kidney Int*. 1997;51(6):1696-1702. doi:10.1038/ki.1997.234
 30. Nowicki S, Chen SL, Aizman O, et al. 20-Hydroxyeicosa-tetraenoic acid (20 HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of rat renal Na⁺,K⁺-ATPase. *J Clin Invest*. 1997;99(6):1224-1230.
 31. Kirchheimer C, Mendez CF, Acquier A, Nowicki S. Role of 20-HETE in D1/D2 dopamine receptor synergism resulting in the inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity

- in the proximal tubule. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2007;292(5):F1435-42. doi:10.1152/ajprenal.00176.2006
32. Garcia V, Gilani A, Shkolnik B, et al. 20-HETE Signals Through G Protein-Coupled Receptor GPR75 (G_q) to Affect Vascular Function and Trigger Hypertension. *Circ Res*. 2017;120(6). doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.310525
 33. Fang X, Dillon JS, Hu S, et al. 20-Carboxy-arachidonic acid is a dual activator of peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007;82(1-4):175-184. doi:10.1016/j.prostaglandins.2006.05.002
 34. Kim DH, Puri N, Sodhi K, et al. Cyclooxygenase-2 dependent metabolism of 20-HETE increases adiposity and adipocyte enlargement in mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J Lipid Res*. 2013;54(3):786-793. doi:10.1194/jlr.M033894
 35. Alexanian A, Sorokin A. Targeting 20-HETE producing enzymes in cancer - Rationale, pharmacology, and clinical potential. *Onco Targets Ther*. 2013;6:243-255. doi:10.2147/OTT.S31586
 36. Guo AM, Sheng J, Scicli GM, et al. Expression of CYP4A1 in U251 human glioma cell induces hyperproliferative phenotype in vitro and rapidly growing tumors in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(1):10-19. doi:10.1124/jpet.108.140889
 37. Rocic P, Schwartzman ML. 20-HETE in the regulation of vascular and cardiac function. *Pharmacol Ther*. Published online 2018. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.07.004
 38. Garcia V, Shkolnik B, Milhau L, Falck JR, Schwartzman ML. 20-HETE Activates the Transcription of Angiotensin-Converting Enzyme via Nuclear Factor- κ B Translocation and Promoter Binding. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;356(3):525-533. doi:10.1124/jpet.115.229377
 39. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther*. 2004;103(2):147-166. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.06.003
 40. Yu M, Alonso-Galicia M, Sun C-W, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE): structural determinants for renal vasoconstriction. *Bioorg Med Chem*. 2003;11(13):2803-2821. doi:10.1016/S0968-0896(03)00192-5
 41. Kim-Kaneyama J, Lei X-F, Arita S, Miyauchi A, Miyazaki T, Miyazaki A. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(7):601-607.

doi:JST.JSTAGE/jat/10736 [pii]

42. Sauer CG, White K, Stöhr H, et al. Evaluation of the G protein coupled receptor-75 (GPR75) in age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(8):969-975. doi:10.1136/bjo.85.8.969
43. Tissue expression of GPR75 - Summary - The Human Protein Atlas. Accessed January 23, 2020. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000119737-GPR75/tissue>
44. Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med.* 2012;18(9):509-515. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.005
45. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
46. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(5):1016-1036. Accessed August 28, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560055>
47. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):115-128. doi:10.1038/nrg2269
48. Duronio RJ, Xiong Y. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(3):a008904. doi:10.1101/cshperspect.a008904
49. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(11):910-916. doi:10.1038/nrm2510
50. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(18):8493-8497. doi:10.1073/pnas.92.18.8493
51. Patil M, Pabla N, Dong Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(21):4009. doi:10.1007/S00018-013-1307-3
52. Wang J. DNA damage and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001;8(11):1047-1048.

doi:10.1038/sj.cdd.4400938

53. Haagenson KK, Wu GS. Mitogen activated protein kinase phosphatases and cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010;9(5):337-340. doi:10.4161/cbt.9.5.11217
54. Riggi N, Aguet M, Stamenkovic I. Cancer Metastasis: A Reappraisal of Its Underlying Mechanisms and Their Relevance to Treatment. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2017;13(1):117-140. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-044127
55. Gómez-Cuadrado L, Tracey N, Ma R, Qian B, Brunton VG. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech*. 2017;10(9):1061-1074. doi:10.1242/dmm.030403
56. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*. 2013;18(1-2):43-73. Accessed August 13, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237552>
57. Katt ME, Wong AD, Searson PC. Dissemination from a solid tumor: examining the multiple parallel pathways. *Trends in cancer*. 2018;4(1):20. doi:10.1016/J.TRECAN.2017.12.002
58. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*. 2012;21(3):283-296. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.003
59. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014;7(344):re8. doi:10.1126/scisignal.2005189
60. Andreiana BC, Stepan AE, Mărgăritescu C, Tăiescu O, Osman A, Simionescu C. Snail and E-Cadherin Immunoexpression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Curr Heal Sci J*. 45(2):185-189. doi:10.12865/CHSJ.45.02.09
61. SNAIL- and SLUG-induced side population phenotype of HCT116 human colorectal cancer cells and its regulation by BET inhibitors. - PubMed - NCBI. Accessed November 5, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31653342>
62. Yoshimoto S, Tanaka F, Morita H, Hiraki A, Hashimoto S. Hypoxia-induced HIF-1 α and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma via TGF- β -dependent EMT. *Cancer Med*. Published online November 2019:cam4.2667. doi:10.1002/cam4.2667
63. Chen M, Liu L. MiR-525-5p Repressed Metastasis and Anoikis Resistance in Cervical Cancer via Blocking UBE2C/ZEB1/2 Signal Axis. *Dig Dis Sci*. Published online November 2, 2019. doi:10.1007/s10620-019-05916-9

64. Dong N, Guo J, Han S, Bao L, Diao Y, Lin Z. Positive feedback loop of lncRNA HOXC-AS2/miR-876-5p/ZEB1 to regulate EMT in glioma. *Onco Targets Ther.* 2019;12:7601-7609. doi:10.2147/OTT.S216134
65. Jeong MH, Kim HR, Park YJ, Chung KH. Akt and Notch pathways mediate polyhexamethylene guanidine phosphate-induced epithelial-mesenchymal transition via ZEB2. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019;380:114691. doi:10.1016/j.taap.2019.114691
66. Hu B, Cheng J-W, Hu J-W, et al. KPNA3 Confers Sorafenib Resistance to Advanced Hepatocellular Carcinoma via TWIST Regulated Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Cancer.* 2019;10(17):3914-3925. doi:10.7150/jca.31448
67. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:4-27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001
68. Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: Turning past failures into future successes. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(6):1147-1155. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0646
69. Clark AG, Vignjevic DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;36:13-22. doi:10.1016/J.CEB.2015.06.004
70. Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 2001;114(15):2713-2722.
71. van Doorslaer de ten Ryen, Deldicque. The Regulation of the Metastatic Cascade by Physical Activity: A Narrative Review. *Cancers (Basel).* 2020;12(1):153. doi:10.3390/cancers12010153
72. Cao Z, Livas T, Kyprianou N. Anoikis and EMT: Lethal "liaisons" during cancer progression. *Crit Rev Oncog.* 2016;21(3-4):155-168. doi:10.1615/CritRevOncog.2016016955
73. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147(2):275-292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024
74. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell.* 2006;10(5):355-362. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.002
75. Mitrugno A, Tormoen GW, Kuhn P, McCarty OJT. The prothrombotic activity of

- cancer cells in the circulation. *Blood Rev.* 2016;30(1):11-19. doi:10.1016/j.blre.2015.07.001
76. Falanga A, Marchetti M, Russo L. The mechanisms of cancer-associated thrombosis. *Thromb Res.* 2015;135(S1):S8-S11. doi:10.1016/S0049-3848(15)50432-5
77. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol.* 2004;167(2):223-229. doi:10.1083/jcb.200408130
78. Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Manjili MH, Jahanban-Esfahlan A, Javaheri T, Zare P. Tumor Cell Dormancy: Threat or Opportunity in the Fight against Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(8). doi:10.3390/cancers11081207
79. Alexanian A, Rufanova V a., Miller B, Flasch A, Roman RJ, Sorokin A. Down-regulation of 20-HETE Synthesis and Signaling Inhibits Renal Adenocarcinoma Cell Proliferation and Tumor Growth. *Anticancer Res.* 2009;29(10):3819-3824. Accessed December 12, 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846914>
80. Alexanian A, Miller B, Roman RJ, Sorokin A. 20-HETE-producing enzymes are up-regulated in human cancers. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2012;9(4):163-169.
81. Gandhi A V., Saxena S, Relles D, et al. Differential expression of cytochrome p450 omega-hydroxylase isoforms and their association with clinicopathological features in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(3 SUPPL.):S636-43. doi:10.1245/s10434-013-3128-x
82. Chen XW, Yu TJ, Zhang J, et al. CYP4A in tumor-associated macrophages promotes pre-metastatic niche formation and metastasis. *Oncogene.* 2017;36(35):5045-5057. doi:10.1038/onc.2017.118
83. Hernando-Rodriguez M, Rey-Barja N, Marichalar-Mendia X, Rodriguez-Tojo MJ, Acha-Sagredo A, Aguirre-Urizar JM. Role of cytochrome P-450 genetic polymorphisms in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(1):1-8. doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01067.x
84. Chen L, Ackerman R, Guo AM. 20-HETE in neovascularization. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2012;98(3-4):63-68. doi:10.1016/j.prostaglandins.2011.12.005
85. Panigrahy D, Kaipainen A, Greene E, Huang S. Cytochrome P450-derived

- eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):723-735. doi:10.1007/s10555-010-9264-x
86. Guo M, Roman RJ, Fenstermacher JD, et al. 9L gliosarcoma cell proliferation and tumor growth in rats are suppressed by N-hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenol) formamidine (HET0016), a selective inhibitor of CYP4A. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(1):97-108. doi:10.1124/jpet.105.097782
 87. Guo M, Roman RJ, Falck JR, Edwards P a, Scicli a G. Human U251 Glioma Cell Proliferation Is Suppressed by HET0016 [N -Hydroxy- N J - (4-butyl-2-methylphenyl) formamidine], a Selective Inhibitor of CYP4A. 2005;315(2):526-533. doi:10.1124/jpet.105.088567.CYP4F
 88. Dhanasekaran A, Bodiga S, Gruenloh S, et al. 20-HETE increases survival and decreases apoptosis in pulmonary arteries and pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(3):H777-H786. doi:10.1152/ajpheart.01087.2008
 89. Wang Z, Tang X, Li Y, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibits the apoptotic responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2008;588(1):9-17. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.045
 90. Guo AM, Janic B, Sheng J, et al. The cytochrome P450 4A/F-20-hydroxyeicosatetraenoic acid system: a regulator of endothelial precursor cells derived from human umbilical cord blood. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338(2):421-429. doi:10.1124/jpet.111.179036
 91. Guo M, Roman RJ, Falck JR, Edwards PA, Scicli a G. Human U251 glioma cell proliferation is suppressed by HET0016 [N-hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenyl)formamidine], a selective inhibitor of CYP4A. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(2):526-533. doi:10.1124/jpet.105.088567.CYP4F
 92. Yu W, Chen L, Yang Y-QQ, et al. Cytochrome P450 ω -hydroxylase promotes angiogenesis and metastasis by upregulation of VEGF and MMP-9 in non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(3):619-629. doi:10.1007/s00280-010-1521-8
 93. Borin TF, Zuccari DAPCPC, Jardim-Perassi B V., et al. HET0016, a Selective Inhibitor of 20-HETE Synthesis, Decreases Pro-Angiogenic Factors and Inhibits Growth of Triple Negative Breast Cancer in Mice. Nie D, ed. *PLoS One.* 2014;9(12):e116247. doi:10.1371/journal.pone.0116247

94. Lin F, Rios A, Falck JR, Belosludtsev Y, Schwartzman ML. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is formed in response to EGF and is a mitogen in rat proximal tubule. *Am J Physiol.* 1995;269(6 Pt 2):F806-16. doi:10.1152/ajprenal.1995.269.6.F806
95. Yu W, Chai H, Li Y, et al. Increased expression of CYP4Z1 promotes tumor angiogenesis and growth in human breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;264(1):73-83. doi:10.1016/j.taap.2012.07.019
96. Cecilia C, Sofía C, Marcela V, et al. Cytochrome 450 metabolites of arachidonic acid (20-HETE, 11,12-EET and 14,15-EET) promote pheochromocytoma cell growth and tumor associated angiogenesis. *Biochimie.* 2020;171-172:147-157. doi:10.1016/j.biochi.2020.02.014
97. Aaron LT, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2016;43(3):279-288. doi:10.1016/j.ucl.2016.04.012
98. Bhavsar A, Verma S. Anatomic Imaging of the Prostate. *Biomed Res Int.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/728539
99. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev.* 2018;32(17-18):1105-1140. doi:10.1101/gad.315739.118
100. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
101. National Cancer Institute NIH. Prostate Cancer - Cancer Stat Facts. Published 2019. Accessed January 26, 2020. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>
102. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *Rev World J Oncol.* 2019;10(2):63-89. doi:10.14740/wjon1191
103. Instituto Nacional del Cáncer. INC - Estadísticas - Incidencia | Argentina.gob.ar. Instituto Nacional del Cáncer. Published 2019. Accessed January 26, 2020. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>
104. Instituto Nacional del Cáncer. INC - Estadísticas - Mortalidad | Argentina.gob.ar. Instituto Nacional del Cáncer. Published 2019. Accessed January 26, 2020.

<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>

105. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(12):1-19. doi:10.1101/cshperspect.a030361
106. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):3-23. doi:10.1038/aps.2014.18
107. Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog.* 2011;10:20. doi:10.4103/1477-3163.83937
108. Huggins C, Hodges C V. Studies on prostatic cancer i. the effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.* 1941;1(4):293-297. doi:10.3322/canjclin.22.4.232
109. Lamb AD, Massie CE, Neal DE. The transcriptional programme of the androgen receptor (AR) in prostate cancer. *BJU Int.* 2014;113(3):358-366. doi:10.1111/bju.12415
110. Huang Y, Jiang X, Liang X, Jiang G. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(5):6063-6076. doi:10.3892/ol.2018.8123
111. van der Steen T, Tindall D, Huang H. Posttranslational Modification of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):14833-14859. doi:10.3390/ijms140714833
112. McGuinness D, McEwan IJ. Posttranslational Modifications of Steroid Receptors: Phosphorylation. In: McEwan PhD IJ, ed. *The Nuclear Receptor Superfamily - Methods in Molecular Biology.* Springer New York; 2016:105-117. doi:10.1007/978-1-4939-3724-0_7
113. Nithipatikom K, Isbell MA, See WA, Campbell WB. Elevated 12- and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in urine of patients with prostatic diseases. *Cancer Lett.* 2006;233(2):219-225. doi:10.1016/j.canlet.2005.03.025
114. Welshons W V, Wolf MF, Murphy CS, Jordan VC. Estrogenic activity of phenol red. *Mol Cell Endocrinol.* 1988;57(3):169-178. Accessed March 26, 2018.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3402660>

115. Dang ZC, Lowik CWGM. Removal of serum factors by charcoal treatment promotes adipogenesis via a MAPK-dependent pathway. *Mol Cell Biochem.* 2005;268(1-2):159-167. doi:10.1007/s11010-005-3857-7
116. Huang W, Shostak Y, Tarr P, Sawyers C, Carey M. Cooperative assembly of androgen receptor into a nucleoprotein complex that regulates the prostate-specific antigen enhancer. *J Biol Chem.* 1999;274(36):25756-25768. doi:10.1074/jbc.274.36.25756
117. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma1. *Cancer Res ICANCER Res.* 1983;43(43):1809-1818. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/43/4/1809%5Cnhttp://cancerres.aacrjournals.org/content/43/4/1809#related-urls>
118. Tai S, Sun Y, Squires JM, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate.* 2011;71(15):1668-1679. doi:10.1002/pros.21383
119. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev.* 2015;82(7-8):518-529. doi:10.1002/mrd.22489
120. Gulvady AC, Dubois F, Deakin NO, Goreczny GJ, Turner CE. Hic-5 expression is a major indicator of cancer cell morphology, migration, and plasticity in three-dimensional matrices. Barber D, ed. *Mol Biol Cell.* 2018;29(13):1704-1717. doi:10.1091/mbc.E18-02-0092
121. Colombero C. Participación del ácido 20-Hidroxicicosatetraenóico (20-HETE) en el mantenimiento de la viabilidad celular mediada por los andrógenos en células de cáncer de próstata. Published online 2017.
122. Deramaudt TB, Dujardin D, Hamadi A, et al. FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Mol Biol Cell.* 2011;22(7):964-975. doi:10.1091/mbc.E10-08-0725
123. Ishizuka T, Cheng J, Singh H, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor- κ B activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(1):103-110. doi:10.1124/jpet.107.130336
124. Pflieger J, Gresham K, Koch WJ. G protein-coupled receptor kinases

- as therapeutic targets in the heart. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(10):612-622. doi:10.1038/s41569-019-0220-3
125. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES. *Annu Rev Biochem.* 1998;67(1):653-692. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.653
 126. Baugher PJ, Richmond A. The carboxyl-terminal PDZ ligand motif of chemokine receptor CXCR2 modulates post-endocytic sorting and cellular chemotaxis. *J Biol Chem.* 2008;283(45):30868-30878. doi:10.1074/jbc.M804054200
 127. Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. New Roles for β -Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. *Mol Cell.* 2006;24(5):643-652. doi:10.1016/j.molcel.2006.11.007
 128. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. Endocytosis of G protein-coupled receptors: Roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. *Prog Neurobiol.* 2002;66(2):61-79. doi:10.1016/S0301-0082(01)00023-5
 129. Krupnick JG, Goodman OB, Keen JH, Benovic JL. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxyl terminus. *J Biol Chem.* 1997;272(23):15011-15016. doi:10.1074/jbc.272.23.15011
 130. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by β -arrestins. *Science (80-).* 2005;308(5721):512-517. doi:10.1126/science.1109237
 131. Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:289-319. doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.289
 132. Asim M, Siddiqui IA, Hafeez BB, Baniahmad A, Mukhtar H. Src kinase potentiates androgen receptor transactivation function and invasion of androgen-independent prostate cancer C4-2 cells. *Oncogene.* 2008;27(25):3596-3604. doi:10.1038/sj.onc.1211016
 133. Nadiminty N, Gao AC. Mechanisms of persistent activation of the androgen receptor in CRPC: Recent advances and future perspectives. *World J Urol.* 2012;30(3):287-295. doi:10.1007/s00345-011-0771-3
 134. Guo Z, Dai B, Jiang T, et al. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell.* 2006;10(4):309-319. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.021

135. Shah K, Bradbury NA. Kinase Modulation of Androgen Receptor Signaling: Implications for Prostate Cancer. *Cancer Cell Microenviron.* 2015;2(4). doi:10.14800/ccm.1023
136. Yu S, Sun L, Jiao Y, Lee LTO. The role of G protein-coupled receptor kinases in cancer. *Int J Biol Sci.* 2018;14(2):189-203. doi:10.7150/ijbs.22896
137. Xia S, He C, Zhu Y, et al. GABABR-Induced EGFR transactivation promotes migration of Human prostate cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2017;92(3):265-277. doi:10.1124/mol.116.107854
138. Arbab AS, Shankar A, Borin T, et al. Combination of vatalanib and a 20-HETE synthesis inhibitor results in decreased tumor growth in an animal model of human glioma. *Onco Targets Ther.* 2016;9:1205. doi:10.2147/OTT.S93790
139. Nowicki S, Kruse MS, Brismar H, Aperia A. Dopamine-induced translocation of protein kinase C isoforms visualized in renal epithelial cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2000;279(6 48-6). doi:10.1152/ajpcell.2000.279.6.c1812
140. Bulavin D V., Fornace AJ. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res.* 2004;92:95-118. doi:10.1016/S0065-230X(04)92005-2
141. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(11):834-846. doi:10.1038/nrc2256
142. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2012;1823(12):2168-2178. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.017
143. Van de Sande T, Roskams T, Lerut E, et al. High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol.* 2005;206(2):214-219. doi:10.1002/path.1760
144. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* 2014;4:64. doi:10.3389/fonc.2014.00064
145. Xue G, Restuccia DF, Lan Q, et al. Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- β signaling axes. *Cancer Discov.* 2012;2(3):248-259. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0270
146. Kaltschmidt B, Greiner J, Kadhim H, Kaltschmidt C. Subunit-Specific Role of NF- κ B in Cancer. *Biomedicines.* 2018;6(2):44. doi:10.3390/biomedicines6020044

147. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, et al. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2004;114(4):569-581. doi:10.1172/jci21358
148. Jin R, Sterling JA, Edwards JR, et al. Activation of NF-kappa B Signaling Promotes Growth of Prostate Cancer Cells in Bone. Wang QJ, ed. *PLoS One*. 2013;8(4):e60983. doi:10.1371/journal.pone.0060983
149. Koren R, Meir D Ben, Langzam L, et al. Expression of protein kinase C isoenzymes in benign hyperplasia and carcinoma of prostate. *Oncol Rep*. 2004;11(2):321-326. doi:10.3892/or.11.2.321
150. Martiny-Baron G, Fabbro D. Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacol Res*. 2007;55(6):477-486. doi:10.1016/j.phrs.2007.04.001
151. Pawlik A, Szczepanski MA, Klimaszewska A, Gackowska L, Zuryn A, Grzanka A. Phenethyl isothiocyanate-induced cytoskeletal changes and cell death in lung cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(10):3577-3594. doi:10.1016/j.fct.2012.07.043
152. Zhou GZ, Cao FK, Du SW. The apoptotic pathways in the curcumin analog MHMD-induced lung cancer cell death and the essential role of actin polymerization during apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2015;71:128-134. doi:10.1016/j.biopha.2015.02.025
153. Budryn G, Grzelczyk J, Pérez-Sánchez H. Binding of Red Clover Isoflavones to Actin as A Potential Mechanism of Anti-Metastatic Activity Restricting the Migration of Cancer Cells. *Molecules*. 2018;23(10):2471. doi:10.3390/molecules23102471
154. Schmidt MCB, Morais KLP, Almeida MES de, Iqbal A, Goldfeder MB, Chudzinski-Tavassi AM. Amblyomin-X, a recombinant Kunitz-type inhibitor, regulates cell adhesion and migration of human tumor cells. *Cell Adhes Migr*. Published online September 25, 2018:1-10. doi:10.1080/19336918.2018.1516982
155. Ito Y, Sadar MD. Enzalutamide and blocking androgen receptor in advanced prostate cancer: lessons learnt from the history of drug development of antiandrogens. *Res Reports Urol*. 2018;Volume 10:23-32. doi:10.2147/RRU.S157116