

Tesis Doctoral

Eventos moleculares en el cáncer de próstata

Sacca, Paula Alejandra

2007

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

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

Cita tipo APA:

Sacca, Paula Alejandra. (2007). Eventos moleculares en el cáncer de próstata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sacca, Paula Alejandra. "Eventos moleculares en el cáncer de próstata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2007.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EVENTOS MOLECULARES EN EL CANCER DE PROSTATA

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

Autora: Lic. Paula Alejandra Sacca

Directora: Dra. Elba Susana Vazquez

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

Buenos Aires, 2007

EVENTOS MOLECULARES EN EL CANCER DE PROSTATA

RESUMEN

La HO-1 es una enzima que ejerce funciones citoprotectoras previniendo el daño oxidativo. Dado que existen reportes controvertidos sobre su función en cáncer, en esta tesis se estudió el rol de HO-1 en cáncer de próstata (PCa), planteándonos la hipótesis de que su inducción en células neoplásicas podría contrarrestar el daño peroxidativo. Evaluamos la expresión y localización celular de HO-1 en tumores primarios y en líneas celulares de PCa (sensibles e insensibles a andrógenos) luego de inducir daño oxidativo y/o exposición a un inductor de esta proteína. Estudiamos proteínas regulatorias del ciclo celular y de la apoptosis. Nuestros resultados muestran que en PCa la marcación nuclear de HO-1 está asociada a la carcinogénesis y a la progresión tumoral. Las líneas celulares mostraron diferente expresión basal de HO-1, probablemente relacionado con el nivel de estrés oxidativo endógeno. La exposición a hemina indujo sobre-expresión y translocación de HO-1 al núcleo en ambas líneas celulares. El estrés oxidativo inducido y/o el tratamiento con hemina moduló diferencialmente el control del ciclo celular, la apoptosis y la distribución en las distintas fases en ambos casos.

Demostramos por primera vez que la expresión y localización nuclear de HO-1 puede definir un nuevo subgrupo de pacientes con PCa y que la modulación de estos parámetros puede representar una nueva estrategia terapéutica.

Palabras clave: hemo oxigenasa-1, cáncer de próstata, estrés oxidativo, progresión tumoral, ciclo celular, apoptosis, marcador tumoral, LNCaP, PC3.

UNRAVELING THE MOLECULAR EVENTS IN PROSTATE CANCER

SUMMARY

Heme oxygenase-1 (HO-1) is a cytoprotective enzyme that prevents oxidative damage. This protein has been detected in several cancer cell lines and tumors, but its role is still controversial and yet to be defined. This dissertation aimed to study its role in prostate cancer (PCa) hypothesizing that its induction in neoplastic cells could counteract the oxidative damage. We assessed the expression and cellular localization of HO-1 in primary tumors of PCa and in androgen-sensitive and androgen-independent cell lines after oxidative stress and/or exposure to a specific HO-1 inducer. Moreover, we studied cell cycle and apoptosis related proteins. Our results showed that nuclear HO-1 staining is associated with carcinogenesis and tumor progression in PCa. Cell lines had different basal levels of HO-1, probably related to the endogenous oxidative stress level. Hemin, a potent inducer of HO-1, up-regulated and translocated it into the nucleus in both cells lines. Oxidative stress and/or hemin exposure differentially modulated the cell cycle, apoptosis and the distribution in the different phases for both cell lines. Furthermore, we have demonstrated for the first time that HO-1 expression and nuclear localization can define a new subgroup of PCa primary tumors and that the modulation of HO-1 expression and its nuclear translocation can represent a new therapeutic avenue.

Key words: heme oxygenase-1, prostate cancer, oxidative stress, tumoral progression, cell cycle, apoptosis, tumoral marker, LNCaP, PC3.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido desinteresadamente a la realización de esta tesis

A La Dra. Elba Vazquez por brindarme la posibilidad de realizar una tesis doctoral. Por los años compartidos y el GRAN ESFUERZO que significó llevar a cabo este trabajo. Por tu aporte intelectual y tus consejos, tu cordialidad y calidad humana. Gracias por continuar trabajando en ciencia con entereza y espíritu, aún en las condiciones más extremas.

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas por sentar las bases de mi formación profesional.

Al Dr. Juan Carlos Calvo quiero dedicarle una mención especial por permitirme finalizar esta tesis en su laboratorio. JC gracias por tu inmensa generosidad.

Al Dr. Osvaldo Mazza por confiar en este proyecto, apoyarlo y darme la oportunidad de acceder a las valiosas muestras de pacientes. Sus comentarios y aportes han sido de sumo valor. Ha sido una suerte para mi el haber podido conocerlo.

Al Servicio de Patología del Hospital Alemán por haberme brindado las muestras de los pacientes. Al Dr. Francisco Celeste y a todo el personal de dicha unidad por la confianza y sobre todas las cosas por vuestra cordialidad.

Al Dr. Gabriel Casas por la selección y la observación de las muestras patológicas y las buenísimas fotos. Por transmitirme conocimientos, por tu buena onda y predisposición.

Al Dr. Roberto Meiss quiero agradecerle su enorme interés en este trabajo y por la minuciosa observación de los preparados patológicos. Gracias por sus consejos útiles, sus gratas charlas y su gran amabilidad.

Gracias Dra. Mónica Kotler por tu hospitalidad, ha sido muy grato trabajar en tu laboratorio. Aprecio mucho tu colaboración en este trabajo. Has sido una gran compañera para mí.

A la Dra. Nora Navone por el enorme aporte que has hecho para llevar a cabo esta tesis y haber podido contar con tus comentarios expertos.

A la Técnica Lina Marino del Hospital Roffo por orientarme con mis primeras inmunohistoquímicas.

Al Dr. Dante Paz y a la Dra. Fabiana LoNostro por la gran disposición para enseñarme a realizar cortes con el micrótomo y aconsejarme en la técnica de inmunohistoquímica.

A la Dra. Lucrecia Calvo por darme una mano enorme con la estadística y por la calidez de cada día.

A la Dra. Adriana DeSiervi por tus comentarios e ideas que han sido de gran utilidad.

Gracias a mis compañeras de laboratorio. A Cynthia Castronuovo y Mercedes Ferrando quienes han contribuido con su mejor predisposición en esta tesis. A las chicas de Mónica por cederme la mesada para trabajar. A Geraldine por la corrección del summary. A Marina, Eleonora, Virginia, Vicky, Vanina y Mariana que me han acompañado y sobre todo soportado! en esta última etapa. A las chicas del "pasillo del fondo", a Ale por su contención y a Vir por alentarme tanto.

A quienes en forma anónima han colaborado con material o con el "préstamo" de un "poquito" de anticuerpo.

Quiero agradecer también

A la Dra. Beatriz Sasseti por iniciarme en el trabajo científico aún siendo estudiante y enseñarme a trabajar en un laboratorio.

Al Dr. Edgardo Romero, en su laboratorio inicié mi carrera de Personal de Apoyo al Investigador del CONICET hace ya más de 15 años, cargo que me permitió continuar trabajando en el ámbito de la investigación científica.

A mis padres por haberme dado la oportunidad de poder estudiar y elegir libremente. A mi familia por su amor y apoyo incondicional.

ABREVIATURAS

AD: andrógeno dependiente

AI: andrógeno independiente

AP-1/2: proteína activadora-1/2

ARE: elemento de respuesta a antioxidantes

Bach-1: factor de transcripción del "zipper"
básico de leucina tipo 1

BHP: hiperplasia benigna de próstata

BVR: biliverdina reductasa

CDK: kinasas dependientes de ciclinas

CDKI: inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas

CYP450: citocromo P450

DHT: 5 α -dihidrotosterona

DO: densidad óptica

ECL: reactivo para quimioluminiscencia

ERG: gen relacionado con ETS

ETS: oncogen del virus E26 de la eritroblastosis

GCs: guanilato ciclasa soluble

GMP: 3',5' guanosina mono fosfato

GST: glutation-S-transferasa

h: hora

HO-1: Hemo oxigenasa-1

ICQ: inmunocitoquímica

IFN- γ : interferón gama

IHQ: inmunohistoquímica

kDa: kilodalton

LPS: lipopolisacáridos bacterianos

MAPK: kinasas activadas por mitógenos

MARE: elemento de reconocimiento a Maf

min: minuto

NADPH: Nicotina adenina dinucleótido fosfato reducido
NE: células neuroendócrinas
NES: secuencia de exportación nuclear
NF- κ B: factor nuclear tipo κ B
NLS: secuencia de localización nuclear
nm: nanometros
Nrf2: factor nuclear eritroide-2
PBS: buffer fosfato salino
PCa: cáncer de próstata
PIA: atrofia inflamatoria proliferativa
PIN: neoplasia intraepitelial
PM: peso molecular
PSA: antígeno prostático específico
RA: receptor de andrógenos
RE: retículo endoplasmático
REI: retículo endoplasmático liso
rpm: revoluciones por minuto
seg: segundo
SMC: células de músculo liso
SnPP: dicloruro de Estaño (IV) Protoporfirina (IX)
StRE: elemento de respuesta a estrés
T: temperatura
TBS: buffer salino Tris
TGF- β : Factor de crecimiento transformante tipo beta
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
VSMC: células vasculares del músculo liso

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	
CÁNCER DE PRÓSTATA	1
La próstata. Aspectos generales	1
Los andrógenos y la próstata	3
Enfermedades de la próstata	3
Hiperplasia Benigna de próstata	3
Cáncer de Próstata	5
Epidemiología	5
Formas de detección del cáncer de próstata	6
Etiología del cáncer de próstata	7
Cáncer y estrés oxidativo	13
Cáncer de próstata y estrés oxidativo	14
Graduación del carcinoma de próstata	17
Marcadores moleculares	18
HEMO OXIGENASA-1	20
Rol fisiológico	20
Isoformas de HO	20
Camino metabólico del hemo	21
Localización	21
Bases moleculares de la regulación de HO-1	24
Regulación del gen <i>ho-1</i> por hemo	26
Productos metabólicos de HO-1	28
Enfermedades asociadas con alteraciones en la expresión de HO-1	30
HO-1 y cáncer	30
HO-1 y cáncer de próstata	36
Factores relacionados a HO-1 y relevantes en cáncer de próstata	36
CRECIMIENTO CELULAR	39
Ciclo celular	39
Las fases del ciclo celular y los puntos de chequeo	39
Ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas	40
Los inhibidores del ciclo celular	41
Proteínas reguladoras del ciclo celular	43
Las ciclinas y su relación con el cáncer de próstata	43
Los inhibidores y su relación con el cáncer de próstata	45
Las kinasas activadoras de ciclinas y su relación con el cáncer de próstata	47
El proteasoma	47
El proteasoma y el cáncer	48
Apoptosis	48
Apoptosis y cáncer de próstata	51
Hemo oxigenasa-1 y su relación con el ciclo celular	52
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
Hipótesis	55
Objetivo general	55

Objetivos específicos	56
MATERIALES Y MÉTODOS	58
Materiales	58
Reactivos y drogas	58
Especímenes de tejido prostático	58
Equipos utilizados	58
Métodos de los experimentos <i>ex vivo</i>	59
Análisis Inmunohistoquímico	59
Análisis estadístico	60
Métodos de los experimentos <i>in vitro</i>	60
Líneas celulares	60
Cultivos celulares	61
Tratamientos realizados	61
Medición de la viabilidad celular	63
Análisis por western blot	63
Fraccionamiento subcelular. Preparación de extractos citoplasmático y nuclear para análisis por western blot	65
Análisis Inmunocitoquímico	66
Citometría de flujo para análisis del ciclo celular	67
Ensayo de actividad de caspasa-3	68
Análisis estadístico	68
RESULTADOS	69
PARTE 1. Estudios <i>ex vivo</i>	70
Estudio de la expresión y localización de Hemo oxigenasa-1 en pacientes con cáncer de próstata. Utilidad como biomarcador	70
Estudio de la expresión/localización de HO-1	70
Análisis inmunohistoquímico de HO-1 en cáncer de próstata y en hiperplasia benigna	71
Análisis de la distribución de la cantidad de casos con tinción nuclear positiva de HO-1 en tejido prostático humano	76
Asociación entre la expresión de HO-1 y los parámetros clínico-patológicos	78
PARTE 2 y 3. Estudios <i>in vitro</i>	81
PARTE 2. Estudio de la expresión y localización de Hemo oxigenasa-1 en células de cáncer de próstata en condiciones basales, sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor o a un inhibidor de dicha proteína	81
Estudio del efecto HO-1 en la modulación del daño oxidativo mediado por H ₂ O ₂ en células de cáncer de próstata	81
Estudio de la expresión de HO-1 en células LNCaP y PC3	81
Citotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno en células LNCaP y PC3	82
Efecto de la hemina sobre la expresión de HO-1 en las células expuestas a daño oxidativo mediado por H ₂ O ₂	84
Efecto del SnPP sobre la expresión de HO-1 en las células	

expuestas a daño oxidativo mediado por H ₂ O ₂	86
Efecto de HO-1 en la modulación del daño oxidativo mediado por H ₂ O ₂	87
Análisis inmunocitológico de la expresión de HO-1 en las líneas celulares LNCaP y PC3	89
Efecto de la hemina en la localización celular de HO-1 en células LNCaP y PC3	91
PARTE 3. Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y la apoptosis en células de cáncer de próstata sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor de HO-1	93
Control del ciclo celular	93
Niveles de expresión de las proteínas regulatorias del ciclo celular en condiciones de daño oxidativo mediado por H ₂ O ₂ y expuestas a hemina	94
Efecto de la modulación de HO-1 en la distribución del ciclo celular	101
Expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis Bcl-2 y Bax	103
Ensayo de actividad de caspasa-3	104
DISCUSIÓN	106
PARTE 1. Estudios <i>ex vivo</i>	106
Estudio de la expresión y localización de Hemo oxigenasa 1 en pacientes con cáncer de próstata. Utilidad como biomarcador	106
PARTE 2 Y3. Estudios <i>in vitro</i>	110
PARTE 2. Estudio de la expresión y localización de Hemo oxigenasa-1 en células de cáncer de próstata en condiciones basales, sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor o a un inhibidor de dicha proteína	110
PARTE 3. Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y la apoptosis en células de cáncer de próstata sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor de HO-1	119
CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFIA	131

A los Pacientes

INTRODUCCION

CANCER DE PROSTATA

La próstata. Aspectos generales

La próstata es una glándula sexual accesoria que rodea a la uretra en la base de la vejiga y forma parte del sistema reproductivo del hombre. Produce secreciones que comprenden la principal fracción (aproximadamente 30%) del plasma seminal del eyaculado humano.

Una próstata sana tiene aproximadamente 3 cm de longitud. Consta de una porción glandular (2/3) y una fibromuscular (1/3).

Según su morfología y función se distinguen las siguientes zonas (**Fig. 1**):

- **Zona anterior (za):** se ubica delante de la uretra, es fibromuscular y no presenta elementos glandulares.
- **Zona central (zc):** Se ubica detrás de la uretra y es atravesada por los conductos eyaculadores. Es una zona glandular.
- **Zona periférica (zp):** es la subdivisión anatómica más grande de la próstata glandular.
- **Zona transicional (zt):** es un pequeño grupo de conductos que están relacionados con la uretra proximal.

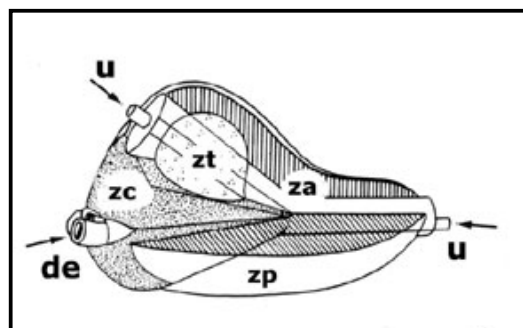


Figura 1: Morfología de la próstata

u: uretra; de: ducto eyaculatorio

La próstata secreta varias proteínas como: fosfatasa ácida, seminina, activador de plasminógeno y antígeno prostático específico (PSA). El PSA es una

serino-proteasa [Wang y col., 1979], cuya función fisiológica es disolver el semen coagulado, que se forma por acción de las proteínas de las vesículas seminales, a los pocos minutos de la eyaculación [Cofey, 1994]. Un aumento de su tenor en la sangre acompaña frecuentemente a un crecimiento anormal de la glándula, por lo cual *el PSA es el marcador más importante, hasta la fecha, para la detección del cáncer de próstata (PCa)*. Existe en el suero en una forma libre (PSA libre) o unido a inhibidores de proteasas (principalmente α -1 antitripsina).

En el epitelio prostático se pueden distinguir tres tipos celulares según sus características morfológicas, su función y su relevancia para la carcinogénesis (**Fig. 2**). El tipo celular epitelial luminal es andrógeno dependiente, produce proteínas secretorias como PSA y expresa el receptor de andrógenos (RA) [Liu y col., 1997]. El segundo tipo corresponde a las células basales, que forman una capa continua y no producen proteínas secretorias prostáticas [Liu y col., 1997; Bui y Reiter, 1998], pero expresan factores que protegen del daño al ADN, tales como la proteína de defensa antioxidante Glutatión-S-Transferasa (GST) y el gen anti apoptótico Bcl-2 [Bui y Reiter, 1998; De Marzo y col., 1998].

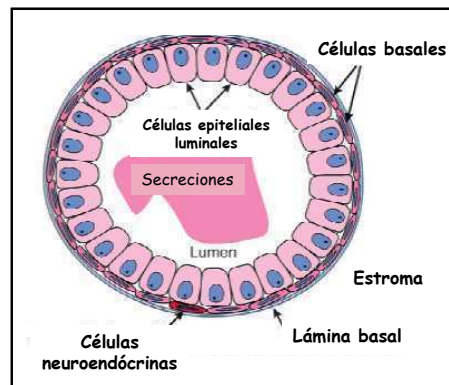


Figura 2. Esquema de los tipos celulares dentro del ducto prostático humano (adaptado de Abate-Shen y col. [2000]).

El tercer tipo celular es el neuroendócrino, es independiente de andrógenos y su acumulación en la capa basal es una característica del PCa agresivo [Abrahamsson y col., 1998]. A pesar de que el PCa frecuentemente expresa

marcadores de células basales, la pérdida de la capa basal es un sello paradójico de la existencia de focos neoplásicos [Bostwick, 1996].

Los andrógenos y la próstata

Los andrógenos regulan el crecimiento de la próstata y la producción de la secreción prostática. Ellos ejercen sus efectos vía el RA, el cual es un activador transcripcional dependiente del ligando. La testosterona, producida por las células de Leydig del testículo bajo la estimulación de la hormona luteinizante, es secretada a la circulación donde es transportada unida a una globulina ligadora de esteroides hasta la próstata. La fracción libre de la testosterona, en equilibrio con la fracción unida, difunde a través de las membranas y entra a la célula prostática. Allí la testosterona es metabolizada a una sustancia más activa llamada 5- α dihidrotestosterona (DHT) que es el principal andrógeno que media el crecimiento de la próstata. La DHT es el producto de la reducción de la testosterona por la acción de la enzima 5 α -reductasa. Esta reacción requiere NADPH. La inactivación de la DHT involucra la reducción reversible a 5- α -androstandiol-3 β ,17 β mediada por la 3 β hidroxisteroide oxidoreductasa, y seguida por 6 α -, 7 α - o 7 β -hidroxilación. La hidroxilación del 5- α -androstandiol-3 β ,17 β representa el último paso de inactivación de la DHT y está catalizada por la enzima citocromo P450. La DHT se une al RA, induciendo un cambio conformacional y la disociación de varias proteínas accesorias, entre ellas las proteínas de shock térmico. La unión de dicho complejo a secuencias de respuesta a andrógenos induce factores transcripcionales y la expresión de genes, tales como el PSA. La DHT también induce la síntesis de factores de crecimiento y de sus receptores, estableciéndose una activa comunicación entre las células epiteliales y las del tejido conectivo (estroma) que las rodea.

Enfermedades de la próstata

Hiperplasia benigna de la próstata

La hiperplasia benigna de próstata (BHP) es una enfermedad clásica relacionada con la edad, que se manifiesta como una forma inocua de agrandamiento no neoplásico de la glándula prostática. Está presente en el 20% de los hombres de 40 años de edad, y la frecuencia de aparición de la enfermedad aumenta al 70% a los 60 años [Sampson y col., 2007].

La BHP se produce principalmente en la zona de transición [Abate-Shen y Shen, 2000]. Aunque el origen exacto de esta enfermedad es desconocido, se piensa que comienza con la aparición de nódulos microscópicos en el tejido periuretral en la zona de transición de la glándula prostática, a edades tan tempranas como los 20 años. Durante el envejecimiento y la presencia de andrógenos, el tejido hiperplásico avanza a un estadio macroscópico que se manifiesta por una glándula agrandada a la palpación y puede causar obstrucción urinaria.

La expresión de un número significativo de genes está alterada en la BHP, en particular la de aquellos genes que codifican para factores de crecimiento derivados del epitelio/estroma (Fig. 3).

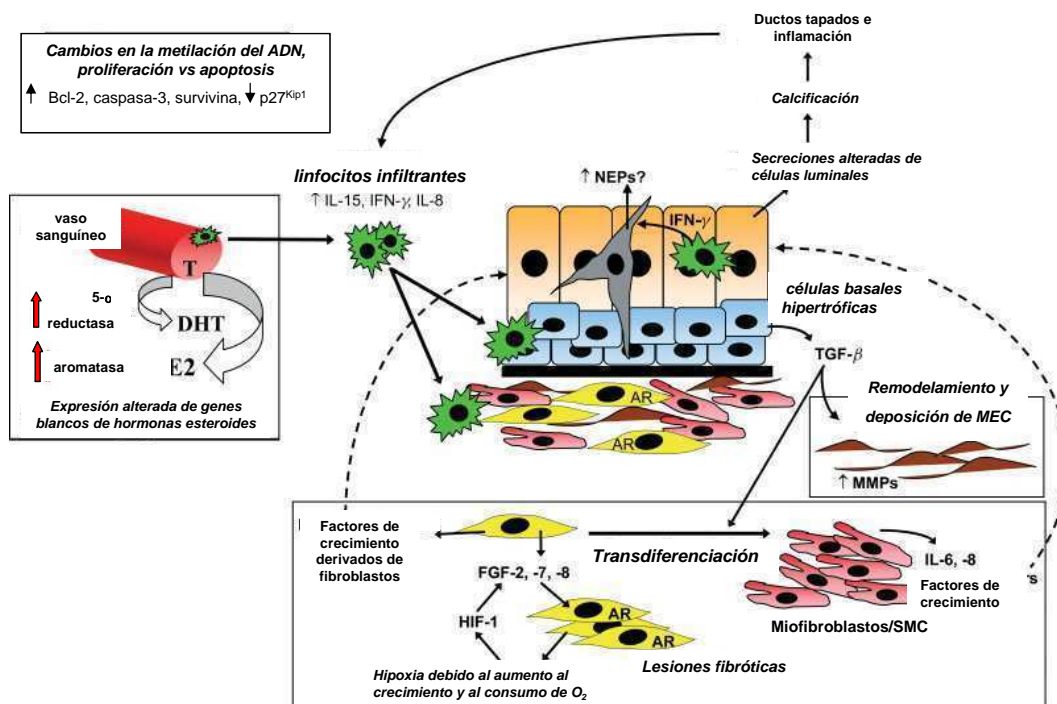


Figura 3. Remodelamiento del tejido en hiperplasia prostática benigna (adaptado

de Sampson y col. [2007]).

La reducción global en la metilación de la cromatina, puede conducir a la expresión alterada de genes, en particular sobre expresión de aquellos que regulan la proliferación celular y disminución de aquellos genes que codifican para mediadores de la apoptosis. Los cambios relacionados con la edad en las hormonas esteroideas sistémicas, junto con la actividad alterada de las enzimas que metabolizan hormonas, conduce a un aumento de la tasa de andrógenos, la cual subsecuentemente modifica la expresión de los genes sensibles a hormonas esteroideas. Además, hay una expresión aumentada del RA. La remodelación del compartimiento estromal ocurre por proliferación de fibroblastos, los cuales secretan factores de crecimiento que actúan sobre el compartimiento epitelial, induciendo proliferación celular. El aumento del consumo de oxígeno del tejido en crecimiento, puede resultar en hipoxia local con posterior sobre expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1) y de los genes respondedores a hipoxia como los factores de crecimiento fibroblástico 2 y 7 (FGF-2 y FGF-7). Las células basales hipertróficas secretan activamente el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual induce transdiferenciación de los fibroblastos estromales en células de músculo liso (SMCs) y miofibroblastos, los cuales posteriormente producen factores mitogénicos. El aumento de TGF- β también induce el remodelamiento de la matriz extracelular (MEC), en particular un aumento de la expresión de metaloproteinasas de MEC (MMPs). Las secreciones alteradas de las células epiteliales luminales conducen a calcificación, ductos tapados e inflamación. Los linfocitos infiltrantes producen citocinas inflamatorias, las cuales posteriormente promueven la proliferación celular y la diferenciación. El interferón γ (IFN- γ) secretado por linfocitos invasores puede inducir diferenciación celular neuroendócrina de las células basales y conducir a un aumento de la secreción de neuropéptidos que promueven el crecimiento.

Cáncer de próstata

Epidemiología

El PCa es el sexto cáncer más común de la población y el tercero más común entre los hombres [Grönberg H, 2003]. Según lo publicado por el Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires en el 2006 en la Argentina el cáncer de próstata constituyó la primera causa de cáncer entre los hombres y la tercera

considerando ambos sexos (detrás del de mama y el de colon). Las tasas de incidencia del PCa son inferiores a 40 casos por cada 100.000 habitantes. Las personas que tienen familiares de primer grado, padre o hermano, que han tenido cáncer de próstata y, sobre todo, si lo han tenido tempranamente (entre los 55 y los 65 años), tienen más probabilidades de contraer esta enfermedad.

Según el Programa estadounidense SEER (encargado del registro y seguimiento de todos los cánceres en ese país), la población de raza negra -no se sabe aún por qué- presenta casi el doble de incidencia de cáncer de próstata en relación a los varones blancos. Los habitantes de América y Europa occidental tienen una incidencia mucho más alta que los asiáticos. (www.ms.gba.gov.ar/EducacionSalud/CancerProstata.htm).

Formas de detección del cáncer de próstata

Síntomas: el PCa es una enfermedad notoriamente silenciosa con pocos signos tempranos. Los síntomas están asociados con obstrucción en el vaciamiento de la vejiga tanto en pacientes con PCa como con BHP.

Examinación rectal digital: es el método tradicional, pero es poco sensible y no específico. Los cánceres detectados por palpación ya han crecido lo suficiente como para deformar la próstata, mientras que otros son tan pequeños que podrían encuadrarse en la definición de cánceres clínicamente no importantes. El tacto rectal no permite evaluar la parte anterior de la próstata y deben emplearse otros medios diagnósticos.

Niveles en suero del PSA: excepto a niveles extremadamente elevados, PSA no es predictivo de las características del cáncer en el paciente individual. Hay otras limitaciones teóricas al uso del PSA para la detección temprana de la enfermedad. Un nivel de PSA normal no excluye el diagnóstico de cáncer. Los falsos negativos (hombres tratados con prostatectomía radical que tenían PSA normales) resultan comunes, tanto como falsos positivos (hombres con PSA elevado con condiciones benignas comunes como BHP, prostatitis, cistitis o vesiculitis seminal). El valor de corte para el nivel de PSA en suero está en constante

discusión. Actualmente entre el 25% y el 30% de los PCa son detectados con valores de PSA entre 2.5 y 4 ng/ml y la mayoría de estos cánceres son clínicamente significativos [Pepe y col., 2006].

Biopsia prostática: es muy precisa para establecer el tipo de cáncer pero desafortunadamente es muy dolorosa y puede complicarse con hemorragia, infección y especialmente septicemia y diseminación tumoral. La gran mayoría de las biopsias resultan negativas, incluso en presencia de cáncer.

Ecografía prostática convencional: permite tener una idea aproximada del tamaño de la próstata, pero debido a su baja sensibilidad se acostumbra complementarla con la biopsia prostática.

El desafío es diagnosticar el cáncer en forma temprana cuando éste está todavía contenido dentro de la glándula, y en la mayoría de los casos tratar de eliminarlo con tratamientos localizados tales como cirugía o radiación. Desafortunadamente, la realidad es que el PCa puede retornar después de un tratamiento localizado, y es imposible predecir con certeza cuales cánceres retornarán. Algunas veces el cáncer no es diagnosticado hasta que éste está en un estado avanzado y se ha dispersado fuera de la próstata (<http://www.prostatecancerfoundation.org/site/pp.asp?c=itlWK2OSG&b=68235>).

Etiología del cáncer de próstata

El PCa se presenta principalmente en la zona periférica de la glándula [Abate-Shen y Shen, 2000].

El PCa tiene distintas fases de progresión (**Fig. 4**):

(1) enfermedad localizada, en la cual el PCa está confinado dentro de la cápsula de la próstata y no se ha dispersado hacia otras partes del cuerpo. El PCa primario es dependiente de andrógenos para crecer y sobrevivir. Entre las fases 1 y 2 surge la enfermedad recurrente donde, después de la terapia localizada, hay signos, típicamente un aumento de PSA, indicando que el cáncer ha reincidido. Este evento no suele ser detectado por los ensayos utilizados corrientemente en la clínica.

(2) enfermedad metastásica, en la cual el PCa está creciendo fuera de la próstata y en las áreas que la rodean.

(3) enfermedad refractaria a hormonas, en la cual el PCa continúa creciendo a pesar del tratamiento con drogas que producen la ablación de las hormonas masculinas (andrógenos/testosterona necesarias para el crecimiento de las células del PCa) en el suero y frecuentemente en combinación con antagonistas competitivos del RA. La cirugía radical del PCa localizado en estadio avanzado es raramente curativa. La radiación también resulta inefectiva y es solo paliativa y la quimioterapia no representa un pronóstico de sobrevida muy prolongada en la mayoría de los protocolos de uso habitual. En este estadio la sobrevida es de entre 12 y 18 meses.

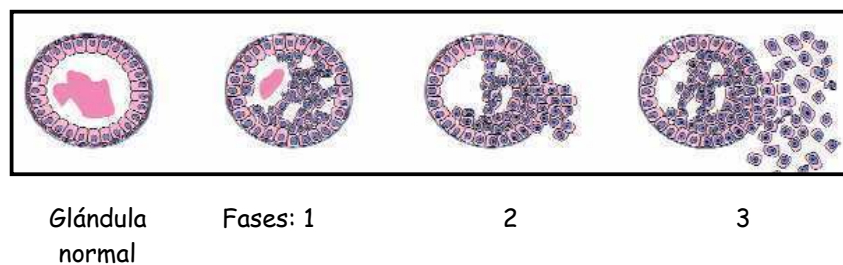


Figura 4. Fases de progresión del cáncer de próstata

No todos los hombres con PCa progresarán a través de estas fases. De hecho, el cáncer de próstata puede permanecer confinado dentro de la glándula indefinidamente y nunca crecer suficientemente rápido para convertirse en un problema en el tiempo de vida de un hombre.

La deprivación de andrógenos ha sido "la llave de oro" en el tratamiento del PCa. Sin embargo, en más del 80% de los casos que mostraron evidencias bioquímicas de respuesta favorable a la ablación hormonal (disminución del PSA y regresión del tumor) el efecto del tratamiento continuo duró entre 2-3 años. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la expresión del RA está presente en el 80% de las lesiones metastásicas, sugiriendo que continúa siendo funcional, aún en ausencia de andrógenos. El RA es visto entonces como un proto-oncogen. Hay varios modelos para explicar la resistencia a hormonas. El tumor

puede tomar varias rutas para sobrevivir a un ambiente deficiente en andrógenos: no reconociendo al RA, perdiendo su expresión o sensibilizando el camino del RA. Para continuar activando este camino las células pueden 1) mutar el RA o volverlo promiscuamente activo por diferentes esteroides; 2) amplificar la expresión del RA; 3) activar el RA en una manera independiente del ligando; o 4) amplificar coactivadores del RA. Chen y col., [2004], mediante el análisis de la expresión de genes por micro arreglos de ADN demostraron que la sobre expresión del RA es suficiente para disparar el proceso de resistencia. Sin embargo, en células que sobre expresan el RA habría cambios en la cantidad y composición de co-activadores y co-represores de los promotores de genes que responden al mismo. Por lo tanto, una modesta alteración en el nivel de la proteína RA podría provocar un desbalance en los cofactores que regulan la transcripción de genes blanco; los antagonistas dejarían de inhibir la transcripción del gen frente a niveles altos del RA [Chen y col., 2004]. El conocimiento de que mecanismos están activos en los distintos estadios de progresión del PCa y como ellos deben interactuar con otros marcadores moleculares, es claramente importante.

La existencia de células "stem" prostáticas localizadas en el epitelio basal está ampliamente aceptada en la actualidad [van Leenders y Schalken, 2001; van Leenders y col., 2003; Schalken y van Leenders, 2003]. Evidencias crecientes soportan este modelo de células stem en PCa, en el cual cambios genéticos y/o epigenéticos se acumulan en dichas células de la próstata durante la vida (envejecimiento), asociados a factores o nichos de células stem que promueven el crecimiento, la supervivencia celular y la diferenciación aberrantes conduciendo a la tumorigénesis (**Fig. 5**) [Rizzo y col., 2005; Wicha y col., 2006; Hill, 2006]. Se ha identificado una población potencial de células stem que forman tumores *in vivo* [Collins y col., 2005]. El evento genético asociado más frecuentemente al tumor es la fusión de la región 5' no traducida del gen regulado por andrógenos *TMPRSS2* a miembros de la familia de los factores de transcripción oncogénicos ETS (oncogen del virus E26 de la eritroblastosis) y *ERG* (gen relacionado con ETS), comúnmente sobre expresados en PCa [Tomlins y col., 2005]. Sin embargo, a pesar de que

varios genes con penetrancia débil o moderada están asociados con el PCa, se piensa que son múltiples las alteraciones genéticas que conducen a su desarrollo [Hughes y col., 2005; Ribeiro y col., 2006; Schulz y Hatina, 2006]. Las diferencias en la susceptibilidad zonal a la enfermedad prostática resulta de la distinta sensibilidad a la hormonas esteroideas sexuales y/o a diferencias en la expresión de genes asociados con la apoptosis [Kirschenbaum y col., 2006]. A pesar de que PCa y BHP son distintas patologías que surgen de diferentes eventos celulares, los perfiles de expresión de los genes involucrados en los distintos estadios del PCa [Dhanasekaran y col., 2001; Nelson y col., 2002; DePrimo y col., 2002] revelan algunas similitudes, indicando un cierto nivel de homogeneidad [Shah y Getzenberg, 2004].

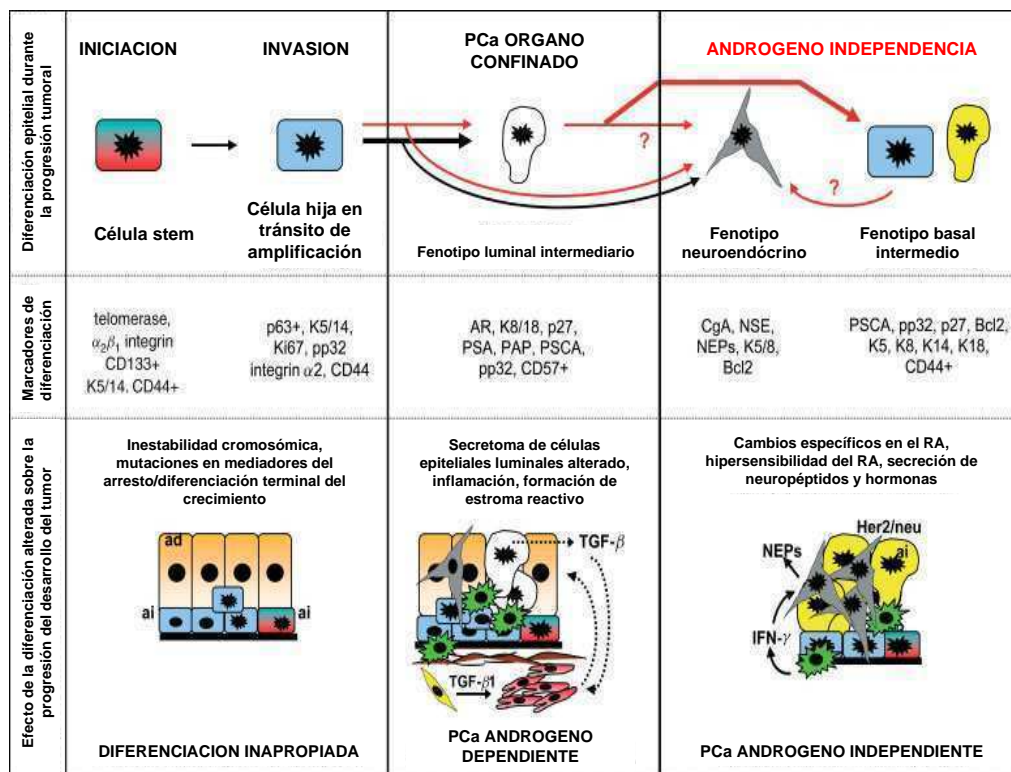


Figura 5. Representación esquemática del proceso de diferenciación en el desarrollo y progresión del PCa (adaptado de Sampson y col. [2007]).

Las células stem andrógeno independientes (AI) de la capa epitelial basal acumulan mutaciones en mediadores de la fase terminal del arresto del crecimiento y la

diferenciación durante el envejecimiento, conduciendo a proliferación y diferenciación inapropiadas de las células hijas en tránsito de amplificación en células intermediarias del lumen. Las células hijas en tránsito de amplificación pueden también diferenciarse en células neuroendócrinas (NE). Los cambios en la secreción de proteínas epiteliales (por ej. células tumorales que secretan activamente TGF- β) que actúan en los alrededores del estroma, inducen la formación de estroma reactivo. El estroma reactivo está asociado con transdiferenciación de fibroblastos en SMC y miofibroblastos, los cuales posteriormente secretan factores de crecimiento que finalmente estimulan la proliferación estromal y epitelial. También es aparente el remodelamiento de la matriz extracelular por mayor producción de metaloproteinasas y componentes estructurales. Los linfocitos infiltrantes estimulan la producción de citocinas inflamatorias, tales como interleukinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8), las cuales promueven la proliferación, la angiogénesis y la metástasis. La ablación/adquisición de la independencia de andrógenos resulta en la apoptosis de las células epiteliales secretoras dependientes de andrógenos (AD), dejando a las células stem y basales independientes de andrógenos intactas. La pérdida de células AD diferenciadas secretoras de TGF- β , libera a las células stem/basales de los efectos inhibitorios del TGF- β , promoviendo una posterior alteración de la proliferación/diferenciación, lo que conduce a la generación de un tumor independiente de andrógenos [Tokar y col., 2005] predominando células de un fenotipo basal intermediario pero también células NE, las cuales secretan neuropéptidos que pueden contribuir a la progresión de la enfermedad. El aumento de la diferenciación de los nichos de células NE es quizás mediado por IFN- γ , secretado por linfocitos. Los niveles aumentados de Her-2/neu permiten a las células basales reanudar la proliferación celular. La **Fig. 5** muestra los marcadores de diferenciación que clasifican a cada uno de los diferentes tipos de células epiteliales. Las células stem de PCa no se han aislado hasta la fecha, de modo que la lista de marcadores de esta figura deriva de estudios provenientes de potenciales células stem de PCa [Collins y col., 2005], células stem de otros cánceres y de células stem prostáticas no tumorigénicas. Las células tumorigénicas que están en tránsito de amplificación pierden la expresión de la integrina β_1 y se diferencian en células de cáncer epiteliales luminales, las cuales son el tipo celular predominante del tumor. El aumento de células NE y su origen dentro del tumor no es claro pero pueden diferenciarse a partir de células tumorales epiteliales luminales o a partir de una célula basal intermediaria AI más diferenciada

Por lo tanto, el concepto corriente de PCa, que tiende a centralizarse en el rol del receptor de andrógeno intacto o mutante, debería reemplazarse por un concepto molecular más comprometedor que involucre eventos moleculares que regulen el ciclo celular, la apoptosis, la invasión local, las células metastásicas y los tejidos huéspedes. El estroma no debe ser considerado meramente como soporte del crecimiento autónomo de las células tumorales. El estroma puede ejercer profundos efectos sobre la iniciación y progresión de la malignidad epitelial. La elucidación del circuito molecular de este "crosstalk" podría influenciar nuestro conocimiento sobre los blancos para las terapias contra el cáncer y puede proveer nuevas estrategias de prevención [Sawyers, 2004]. Estos datos podrían orientar las terapias por depleción hormonal hacia nuevos rumbos en los estadios tempranos y avanzados de la enfermedad y dirigir la investigación hacia nuevas conductas terapéuticas que impliquen modificaciones de la respuesta del tejido huésped, como una manera de controlar el crecimiento tumoral metastásico.

El PCa es único entre los tumores sólidos, en los que la mayor amenaza para la supervivencia del paciente y su calidad de vida está dada por la metástasis al hueso, más que la enfermedad visceral en sí misma [Morris y Scher, 2003]. Los tumores resultantes tienden a formar hueso (osteoblásticos) más que degradarlo (osteolítico), lo que conlleva a dolor y compresión de la médula espinal. Las metástasis a hueso con un fenotipo formador de hueso son el resultado de la estimulación de osteoblastos e inhibición de osteoclastos por las células del cáncer. Los osteoblastos en sí mismos secretan factores que facilitan la progresión del PCa al hueso [Logothetis y Lin, 2005]. Además, el tumor produce factores que estimulan el crecimiento y la formación de hueso nuevo [Choueiri y col., 2006]. El TGF- β aumenta la diferenciación osteoblástica, promueve la formación de matriz e inhibe su degradación. Se ha observado que pacientes con PCa tienen niveles aumentados de TGF- β [Zhu y Kyprianou, 2005], y que células de PCa además estimulan el crecimiento óseo a través de la producción de factores de crecimiento como insulina (IGFs), que estimulan a los osteoblastos y reducen la degradación de la matriz, y de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), la cual

activa osteoclastos y osteoblastos [Deftos y col., 2005]. La estimulación del crecimiento del hueso está en parte regulada por proteínas que unen IGFs (IGFBPs) las cuales también son producidas por el tumor [Cohen y col., 1993]. Asimismo, el PSA juega un rol en la regulación del crecimiento del hueso al clivar IGFBPs tanto como TGF- β latente [Fielder y col., 1994]. El tumor es capaz de modular directamente las interacciones entre osteoblastos y osteoclastos. El receptor activador del factor nuclear NF- κ B (RANK) está presente en los precursores de osteoclastos, puede disparar la formación de estos y su señalización, y se activa cuando se une a su ligando RANKL, el cual está expresado en osteoblastos e induce osteoclastogénesis a partir de precursores hematopóieticos [Li y col., 2000]. Por otro lado la endotelina-1 (ET-1) activa osteoblastos [Guise y col., 2003] y es inducida por factores como TGF- β y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) [Le Brun G. y col., 1999]. Se observó que en pacientes con enfermedad metastásica, los receptores de endotelina están sobre expresados [Carducci y col., 2003].

Cáncer y estrés oxidativo

La regulación redox es uno de los mecanismos clave de adaptación a una variedad de estímulos de estrés, incluyendo el estrés oxidativo [Ridnour y col., 2004; Toyokuni, 2004].

Alteraciones múltiples del genoma son responsables de la carcinogénesis [Sugimura, 1992]. Un exceso de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno pueden causar daño y modificaciones al ADN [Toyokuni, 1999; Ohshima y col., 2003], conduciendo a alteraciones en la información del genoma debido al fuerte impacto sobre las enzimas de reparación y los caminos apoptóticos. Estos cambios de la información genética son generados por mutaciones puntuales, inserciones o translocaciones cromosomales. Estos eventos pueden causar la activación de oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores (genes reparadores del ADN y genes inhibidores del ciclo celular). Los genes relacionados con la apoptosis también juegan un rol en la carcinogénesis

[Vogelstein B y col., 1998]. La Fig. 6 muestra el significado del estrés oxidativo en la carcinogénesis. Las mutaciones y la persistente activación de nuevos caminos de señalización para la proliferación están interrelacionados. Las mutaciones selectivas de oncogenes generan nuevos caminos de señalización, mientras que la proliferación celular aumentada, incrementa la tasa de mutaciones. En este sentido, la carcinogénesis puede ser comparada con la evolución, con la diferencia que la carcinogénesis es fatalmente impaciente con el tiempo [Toyokuni, 2006].

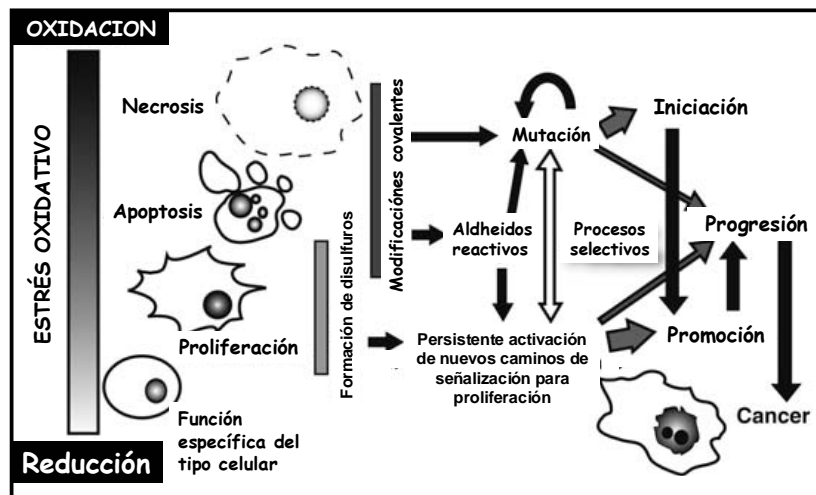


Figura 6. Significado del estrés oxidativo en la carcinogénesis (adaptado de Toyokuni y col. [2006]).

Ciertas secuencias específicas del ADN son vulnerables al estrés oxidativo [von Zglinicki y col., 2000]. Es posible que estas áreas puedan diferir dependiendo de la clase de célula y del entorno donde se encuentra la misma. Tal diferencia podría explicar los distintos caminos de señalización adquiridos por los diferentes tipos de cáncer.

Cáncer de próstata y estrés oxidativo

El carcinoma prostático es una enfermedad asociada con la edad [Ames y col., 1993; Malins y col., 2001]. Este estado junto con la predisposición genética, raza, factores ambientales, dieta, agentes infecciosos, exposición a andrógenos y

otras hormonas [Fleshner y Klotz, 1998; Gann, 2002; Grover y Martin, 2002; Fleshner y col., 2004; Klein y col., 2006], producen un desbalance redox que conduce a un estado oxidativo mayor del tejido.

El rol del estrés oxidativo en el cáncer de próstata ha sido ampliamente reconocido [De Marzo y col., 2003]. Dicho estrés produce remodelamiento y proliferación del tejido. La inflamación aguda y crónica generada por especies reactivas de oxígeno (ROS) en el sitio de la inflamación, conlleva al daño de las estructuras celulares. La exposición al estrés oxidativo crónico debe ser uno de los posibles factores etiológicos en el desarrollo del cáncer [Toyokuni, 1999]. La inflamación puede producir la destrucción de las células epiteliales de la próstata y esto puede conducir a un aumento de la proliferación como respuesta compensatoria a la muerte celular. Tal proliferación puede estar mecánicamente relacionada a una disminución del inhibidor del ciclo celular p27^{Kip1} como se observó en la atrofia inflamatoria proliferativa (PIA: focos de epitelio glandular proliferativo con la morfología de atrofia simple o hiperplasia postatrófica, ambas en relación con la inflamación crónica) [De Marzo y col., 1999]. La disminución de la apoptosis asociada con estos eventos puede también estar relacionada a un aumento de la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 [De Marzo y col., 1999]. Un aumento de estrés oxidativo y electrofílico en un ambiente de proliferación asociado con estos eventos, puede conducir a la elevación de la expresión de la isoforma P1 de la GST (GST-P1) como una medida protectora del genoma [De Marzo y col., 2003]. Sin embargo, la metilación aberrante de las islas CpG del promotor del gen GST-P1 silencia la expresión y los niveles de proteína de este gen, provocando daño genético adicional, y acelerando la progresión hacia la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y carcinoma [De Marzo y col., 2003].

En pacientes con cáncer de próstata, se han detectado alteraciones en la peroxidación lipídica con cambios concomitantes en el sistema de defensa antioxidante. Esto conduce a un balance pro oxidante-antioxidante alterado que puede producir un aumento del daño oxidativo y consecuentemente jugar un rol importante en la carcinogénesis de la próstata [Aydin y col., 2006].

La **Fig. 7** muestra los pasos en el desarrollo del PCa [Rubin y De Marzo, 2004]. El epitelio prostático con apariencia normal puede derivar en PCa clínicamente localizado y sensible a andrógenos a través de dos caminos. El epitelio normal puede sufrir alteraciones a nivel molecular en genes guardianes y derivar en lesiones neoplásicas intraepiteliales. Este proceso puede también proceder a través de la atrofia inflamatoria proliferativa. La inflamación crónica de larga duración se ha ligado al desarrollo de carcinoma en varios órganos y sistemas [Anim y col., 1998]. La atrofia glandular prostática, se ha señalado como un precursor potencial del adenocarcinoma prostático y sucede en estrecha asociación con la inflamación crónica [Gerstenbluth y col., 2002]. Alternativamente el PCa, puede desarrollarse a través de más de un camino derivado de PIA y PIN de alto grado. Se han encontrado múltiples genes alterados y múltiples mutaciones en el RA en el PCa refractario a hormonas.

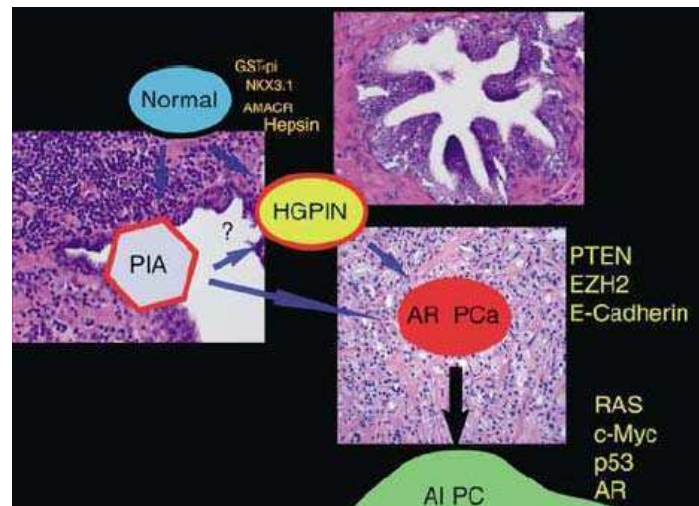


Figura 7. Pasos putativos en el desarrollo del cáncer de próstata (adaptado de Rubin y de Marzo [2004]).

Por lo tanto, el conocimiento del estado oxidativo en el tejido prostático puede proporcionar una herramienta para la prevención o detección temprana del PCa.

Graduación del carcinoma de próstata

D. Gleason creó en 1966 un sistema de graduación para los carcinomas de próstata [Bailar III y col., 1966; Gleason, 1966], basado en el patrón arquitectural del tumor llamado "Grado de Gleason". Este sistema clasifica microscópicamente a las células desde bien diferenciadas (grado 1) hasta muy indiferenciadas (grado 5) (Fig. 8).

Mediante observación microscópica del tejido se determinan los dos patrones estructurales (primario y secundario) de mayor área, sumando un mínimo de 2 puntos y un máximo de 10 puntos. Los grados 1 y 2 son normales. El grado 3 (células moderadamente diferenciadas) es el más común y considerado aún normal. El grado 4 corresponde a cáncer y es el más importante y a veces difícil de diferenciar del grado 3. El grado 5 es indiferenciado y las células parecen propagarse muy desordenadamente. Para su evaluación clara, se debe reportar como la suma de los dos patrones, por ejemplo 7 (3+ 4). Así, un Gleason 10 será, en términos simples, el más grave de todos, y un Gleason 2 totalmente normal.

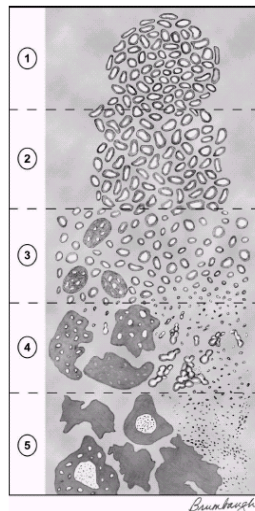


Figura 8: Diagrama esquemático de la graduación de Gleason

Según la modificación del 2005 de la International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma, el sistema de Gleason se modificó de manera que se definieron los siguientes patrones o grados [Epstein y col., 2005].

Grado 1: nódulos circunscritos por acinos empacados, uniformes, redondeados u ovales, de medida regular (glándulas más grandes que el grado 3).

Grado 2: es semejante al patrón 1, con nódulos más circunscriptos, sin embargo en el borde del nódulo puede haber mínima infiltración. Las glándulas están más dispersas y no como un patrón de Gleason 1 con morfología uniforme.

Grado 3: se observan unidades glandulares discretas, con glándulas más pequeñas que las del Gleason 1 y 2. Hay infiltrados en y entre los acinos no neoplásicos de la próstata. Con marcada variación en la medida y la forma. Presenta patrón nodular cribiforme

Grado 4: masas de acinos irregulares y epitelio fusionado, con células claras. Presenta glándulas cribiformes grandes y con borde irregular.

Grado 5: esencialmente no hay diferenciación glandular, compuesta de capas sólidas, cordones, o células simples. Carcinoma anaplásico con necrosis central rodeado por masas de papilas, cribiformes o sólidas.

Marcadores moleculares

Se consideran marcadores moleculares a aquellas sustancias que pueden cuantificarse objetivamente a nivel tisular o en distintos fluidos fisiológicos o patológicos del paciente.

El proceso que media desde el laboratorio de investigación hasta la aplicación de biomarcadores en poblaciones humanas es complejo. A partir del conocimiento del comportamiento biológico de los tumores malignos, se evalúa la eventual utilidad de los factores producidos por las células tumorales, o por las células vecinas estimuladas por éstas, como posibles marcadores moleculares.

Dada la gran heterogeneidad que caracteriza al tejido tumoral prostático, es difícil que un único marcador refleje el comportamiento biológico de este carcinoma. El desarrollo de paneles de expresión de genes útiles clínicamente es un desafío constante a fin de aumentar la especificidad y sensibilidad en la detección del PCa.

En una de cada cuatro biopsias se hallan evidencias de cáncer, lo que significa que un 75% de las biopsias son innecesarias. La capacidad de distinguir entre los diferentes grados de cáncer por medición de los niveles de genes marcadores en tejido, sangre y aún posiblemente en semen, podría reducir el número de biopsias innecesarias, pudiendo ser de utilidad para identificar a aquellos hombres con una necesidad urgente de tratamientos más agresivos.

Los marcadores moleculares o biomarcadores tienen el potencial no solo de servir como factores pronósticos sino también ser blancos para nuevas estrategias

terapéuticas y predictores de respuesta en un amplio número de cánceres, incluyendo el de próstata.

La biología molecular del PCa y su progresión está caracterizada por la actividad aberrante de varios caminos regulatorios, tanto dentro de las células de la próstata como en el tejido circundante. Estos caminos pueden ser agrupados en apoptosis, señalización del RA, transducción de señales, reguladores del ciclo celular, adhesión celular y cohesión y angiogénesis (**Tabla 1**) [Quinn y col., 2005]. Las variaciones en los niveles de ADN/ARN y/o proteínas de moléculas involucradas en estos caminos son potenciales marcadores candidatos de pronóstico y respuesta terapéutica en PCa.

Tabla 1. Resumen de las aberraciones moleculares en PCa [Quinn y col., 2005]

Procesos	Moléculas clave/marcadores
Apoptosis	p53, Bcl-2
Señalización del RA	RA y posibles caminos de transducción de señales alternativos
Transducción de señales	Familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico
Regulación del ciclo celular	c-Myc, p16 ^{INK4A} , p27 ^{KIP1} , pRb, Ki67
Adhesión celular y cohesión	E-cadherina, α -catenina, metaloproteinasas, condroitin sulfato
Angiogénesis	VEGF, receptores de VEGF, óxido nítrico

Actualmente se están desarrollando formas de terapias personalizadas contra el cáncer. La prevención no es menos importante que la terapia, considerando el impacto económico de los protocolos terapéuticos de uso corriente. En un futuro cercano, hacer prevención contra el cáncer "a medida" para cada individuo puede resultar un desafío crítico. Por lo tanto, será de importancia el aporte del estudio y el establecimiento de marcadores confiables de estrés oxidativo en PCa.

HEMO OXIGENASA-1

Rol fisiológico

La historia de la Hemo oxigenasa (HO) (HO, EC 1.14.99.3) comienza con nuestros orígenes. El oxígeno acumulado en la atmósfera primordial que contenía nitrógeno, confrontó a nuestros ancestros, evolutivamente distantes, con una oportunidad y un daño nuevo. El oxígeno necesario para mantener la vida multicelular es intrínsecamente tóxico. Para hacer uso del oxígeno, las células tuvieron que evolucionar y desarrollar mecanismos para sobrevivir al estrés oxidativo. Uno de los mecanismos más ubicuos es la enzima HO [Morse y Choi, 2005], la cual se encuentra preservada tanto en las algas verde-azules como en los humanos, y esto indica el éxito de esta estrategia celular para la protección y su importancia en la sobrevivencia [Foresti y Motterlini, 1999].

La HO fue descubierta en 1968 cuando Tenhunen y col. [1968] describieron el mecanismo de la reacción para el catabolismo del hemo. La HO es la enzima que cataliza el paso limitante en la degradación oxidativa del hemo [Tenhunen y col., 1969]

Isoformas de HO

Hasta la fecha se han identificado tres isoformas de HO, producto de distintos genes: HO-1 que es inducible [Maines y col., 1986], HO-2 [Trakshel y Maines, 1989; McCoubrey, Jr. y Maines, 1994] y HO-3 que son isoformas constitutivas [McCoubrey, Jr. y col., 1997; Elbirt y Bonkovsky, 1999].

HO-1 pesa 32 kDa. Es inducible en virtualmente todos los tipos celulares por diversos estímulos de estrés celular como metales pesados [Maines y Kappas, 1974], citocinas [Kapturczak y col., 2004], endotoxinas [Gemsá y col., 1974], lipopolisacáridos bacterianos (LPS) [Immenschuh y col., 1999], shock térmico [Shibahara y col., 1987], hemo [Tenhunen y col., 1970; Hayashi y col., 1999], peróxido de hidrógeno [Keyse y Tyrrell, 1989], hiperoxia [Lee y col., 1996], e hipoxia [Minamino y col., 2001].

HO-2 está expresada en forma constitutiva en la mayoría de los tejidos: cerebro, hígado, bazo y testículos [Maines y col., 1986; Trakshel y col., 1986; Maines, 1997; Maines, 2005b]. No responde a los inductores de HO-1 con la excepción de los glucocorticoides [Maines, 2000].

Se conoce poco sobre HO-3. Comparte un 90% de homología con HO-2 y fue detectada únicamente en cerebro de rata. Se ha sugerido que podría tener un rol regulatorio en procesos que son dependientes de hemo [McCoubrey, Jr. y col., 1997; Hayashi y col., 2004].

La acción de HO puede ser inhibida por ciertos análogos sintéticos del hemo en los cuales el átomo de hierro central es reemplazado por otros metales [Chernick y col., 1989].

Camino metabólico del hemo

El sistema HO se une a su sustrato en una posición específica del bolsillo proteico para formar el complejo hemo-enzima. La reacción requiere de O_2 y usa a la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa para transportar electrones desde el NADPH al complejo. HO y NADPH-citocromo P450 reductasa necesitan estar asociadas para transferir dichos electrones (**Fig. 6A**). La activación del O_2 es llevada a cabo por el sustrato hemo y sus dos intermediarios, α -meso-hidroxihemo y verdohemo [Kikuchi y col., 2005b] (**Fig. 6B**). Luego se produce la apertura del anillo tetrapirrólico del hemo por clivaje del puente α -meso-carbono, y se liberan tres productos biológicamente activos para la célula: biliverdina, CO y Fe^{2+} . Posteriormente la biliverdina es rápidamente convertida a bilirrubina por medio de la biliverdina reductasa (BVR) [Tenhunen y col., 1970]. El ión Fe^{2+} y la bilirrubina están relacionados con el balance redox celular [Galbraith, 1999].

Localización

Históricamente HO-1 se caracterizó por su localización en el retículo endoplasmático liso (REI) como una proteína integral de membrana [Tenhunen y col., 1968; Tenhunen y col., 1969]. Sin embargo, trabajos de los últimos años han

detectado su redistribución en varias fracciones celulares, luego de la inducción por estrés [Kim y col., 2004].

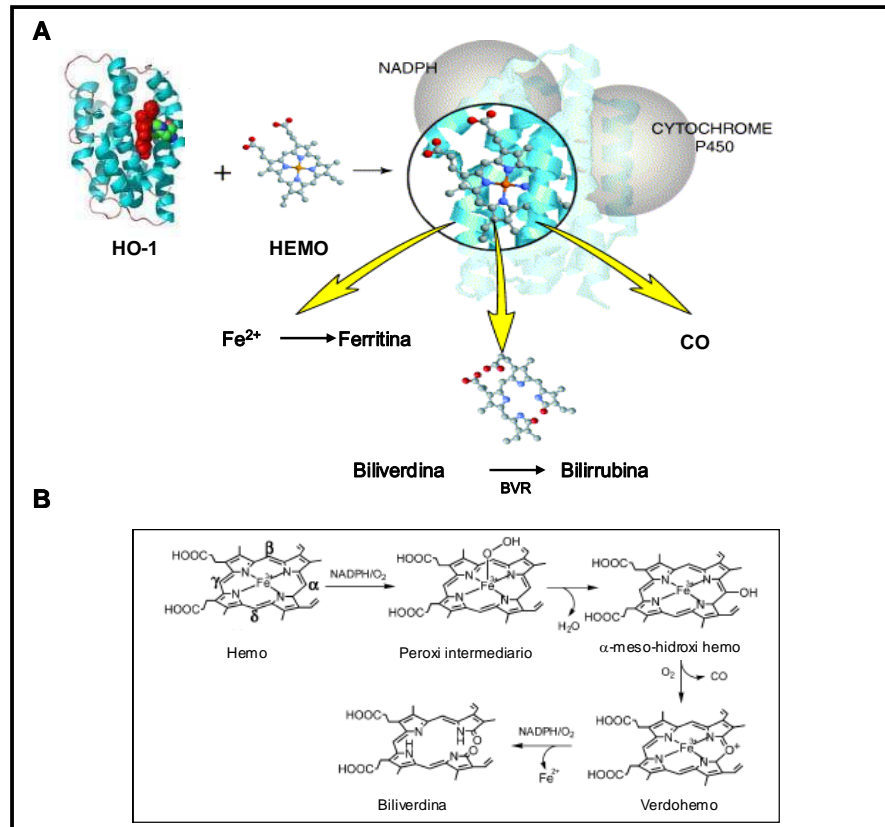


Figura 6. Acción enzimática de la Hemo oxigenasa-1

A) la HO-1 interacciona con hemo para rendir los productos CO, biliverdina y Fe^{2+} . B) Ciclo catalítico de la hemo oxigenasa. El paso clave es la hidroxilación inicial para dar el α -meso-hidroxi hemo. Este paso requiere dos electrones del NADPH, vía NADPH-citocromo P450 reductasa. Los pasos siguientes que conducen a verdohemo y biliverdina son únicos de la hemo oxigenasa (adaptado de Otterbein y col. [2003] y Poulos y col. [2005])

La actividad de HO-1 es alta en fracciones microsomales que contienen membranas celulares, y la proteína pudo aislarse en asociación con NADPH-citocromo P450 reductasa y NADPH-biliverdina reductasa [Yoshinaga y col., 1982]. HO-1 contiene un dominio carboxi terminal hidrofóbico, el cual le permite anclarse en las membranas celulares [Shibahara y col., 1985; Keyse y Tyrrell, 1989]. La expresión constitutiva del cADN de HO-1 de rata en células de riñón de

mono (COS-7) condujo a la localización de dicha proteína en el retículo endoplasmático [Shibahara y col., 1985].

En células endoteliales quiescentes de la microvasculatura cerebral de cerdos recién nacidos se observó, mediante inmunofluorescencia, que HO-1 se distribuía en la envoltura nuclear y en la zona perinuclear del citoplasma, pero no se observó tinción en el núcleo [Parfenova y col., 2001].

Se reportó localización nuclear de HO-1 en cultivos primarios de células astrogiales de rata, y se sugirió que su translocación estaría asociada a mecanismos involucrados en el desarrollo del cerebro y en enfermedades neurodegenerativas, indicando que esta proteína podría modular los caminos de transducción de señales y funcionar como un mecanismo importante para la regulación de factores de transcripción nucleares [Li Volti y col., 2004].

En células endoteliales arteriales de pulmón de rata (PAEC) ciertos inductores de HO-1 (hemina o LPS) o su sobre expresión provocada por hipoxia alteró su patrón de distribución celular. Se midió actividad de HO-1 en membrana plasmática, citosol y en caveolas aisladas y la expresión de HO-1 aumentó en la fracción de membrana plasmática resistente a detergentes que contenía caveolina-1. Además, se detectó actividad de BVR endógena en las caveolas, apoyando las evidencias que demuestran que ambas enzimas se encuentran en el mismo compartimiento celular [Kim y col., 2004].

Slebos y col. [2006] encontraron acumulación de la proteína activa en la mitocondria de células epiteliales de pulmón, preservando la producción de ATP mitocondrial y previniendo la muerte celular en respuesta a formas discretas de estrés. Converso y col. [2006] observaron localización mitocondrial de HO-1 en hígado de rata, proponiendo que HO-1 tendría un rol biológico importante en regular la tasa de proteínas hémicas mitocondriales y en la protección contra condiciones en las cuales está implicada la producción de oxidantes.

En células de pulmón de fetos de rata (RFL-6), transfectadas con la secuencia completa del ADN de HO-1 y expuestas a hiperoxia se observó localización perinuclear seguida por migración hacia el núcleo [Suttner y col.,

1999]. Este fenómeno no se había reportado previamente y se propuso que HO-1 podría servir como una chaperona o un mensajero nuclear. Además, un hecho interesante para resaltar es que cuando el nivel de la actividad de HO-1 era bajo, la proteína estaba localizada en el núcleo pero aún había aumento de la supervivencia celular bajo hiperoxia. Sin embargo, no es claro si la proteína HO-1 en sí misma puede tener un rol protector en el núcleo [Suttner y col., 1999]. También podría especularse que HO-1 nuclear inhibiese la sobre expresión de HO-1, ya que otros autores han reportado refracción de la inducción adicional de la proteína y un posible mecanismo de retro alimentación negativo [Noel y Tyrrell, 1997].

Giordano y col. [2000] detectaron un aumento de núcleos con tinción positiva para HO-1 en tejido adiposo marrón de ratas expuestas a estrés térmico, y señalaron que los productos secundarios de HO-1 fueron capaces de modular genes involucrados en la adipogénesis.

En el cerebro de rata se detectó inmunotinción positiva de HO-1 y HO-2 en la zona perinuclear. El nivel de la expresión de HO-1 fue similar entre cerebros de ratas viejas y cerebros humanos con enfermedades neurodegenerativas [Ewing y Maines, 2006]. El tratamiento con drogas neuroprotectoras aumentó notoria y selectivamente la expresión de HO-1 en el núcleo de las células de la septa triangular en animales jóvenes [Wang y col., 2003; Ewing y Maines, 2006].

La función de HO-1 en el núcleo podría estar relacionada con su fosforilación y con la transcripción de genes. Sin embargo, hasta la fecha, el conocimiento de la compartimentalización intracelular de HO es limitado y su función en dicho compartimiento debe ser dilucidada ya que parece ser tejido dependiente.

Bases moleculares de la regulación de HO-1

El gen *ho-1* se compone de 5 exones y cuatro intrones [Maines y Gibbs, 2005]. El control transcripcional de esta proteína es gobernado por elementos regulatorios inducibles localizados en la región 5' flanqueante del promotor del

gen *ho-1*. En el análisis del locus del gen se ha identificado una secuencia de 10 pares de bases, denominada elemento de respuesta a estrés (StRE), que se presenta en múltiples copias entre dos regiones enhancer río arriba y que media la activación transcripcional en respuesta a casi todos los inductores de HO-1 [Alam y col., 2004]. El StRE es funcional y estructuralmente similar a ARE (elemento de respuesta a antioxidantes) y MARE (elemento de reconocimiento a Maf) y los tres elementos se utilizan indistintamente cuando se trata de la regulación de HO-1 [Alam y Cook, 2007]. Estos elementos regulatorios son sitios de unión para diversos factores de transcripción sensibles a estrés oxidativo [Shibahara y col., 1989; Lavrovsky y col., 1993; Alam y col., 1994; Lu y col., 2000; Alam y col., 2004] como el factor nuclear NF- κ B y la proteína activadora-1/2 (AP-1/2) [Lavrovsky y col., 1994; Camhi y col., 1998], la proteína de unión CCAAT/enhancer [Rushworth y O'Connell, 2004], el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) [Lee y col., 1997; Jozkowicz y col., 2002], la proteína de unión al elemento de respuesta a adenosina 3',5' monofosfato cíclico (cAMP) (CREB) [Kronke y col., 2003], el miembro de la familia del factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) [Alam y col., 1999; Alam y col., 2000] y los elementos de respuesta a hemo y cadmio [Alam y col., 1994; Hill-Kapturczak y col., 2003]. Se han observado variaciones funcionales en los promotores de distintas especies, lo que conduce a diferentes respuestas frente a los estímulos que inducen HO-1 [Shibahara y col., 1989; Takeda y col., 1994].

La primera asociación entre BVR y HO-1 provino de los estudios que demostraron la localización nuclear de la BVR en riñón de rata en respuesta a inductores de HO-1 [Maines y col., 2001]. El significado de esta localización puede reflejar múltiples factores que se originan de la actividad de la reductasa.

La BVR es activada por oxidantes [Salim y col., 2001]. Como ya hemos expuesto, el producto de la actividad de la BVR, la bilirrubina, cumple diversas actividades en la célula y podría proteger a los componentes nucleares contra el daño de los radicales libres, por ser efectiva en la ruptura de la cascada en cadena de radicales [Maines y col., 2001].

Una acelerada tasa de conversión de biliverdina a bilirrubina, es decir la inactivación de la biliverdina, permite la inducción de la expresión de *ho-1* y el consecuente aumento de la actividad de degradación de hemo; la subsiguiente inhibición por retro alimentación negativa de la actividad de la BVR por su producto (bilirrubina) permitiría la acumulación de biliverdina, causando inhibición por producto final (biliverdina) de la oxigenasa y permitiendo por lo tanto un retorno a las condiciones normales de la degradación de hemo [Maines, 2005a]. Un gran número de genes que regulan el gen de *ho-1* parecen estar sujetos a la regulación por BVR. Los genes identificados por micro arreglo en células humanas de riñón fueron: ATF-2/CREB-2, c-Jun, y factor de transcripción a shock térmico-1 (HSF1), Bcl-2, Cox-2, PKCa, HSP 90 y 27 [Kravets y col., 2004]. Es altamente probable que BVR ejerza influencia en la expresión de HO-1 controlando la actividad del gen represor Bach1 (factor inducible por hipoxia o factor de transcripción del "zipper" básico de leucina 1) regulado por hemo [Ogawa y col., 2001b] y que forma un complejo con la proteína Maf. La formación del complejo BVR-Maf podría bloquear la actividad represora de Bach1 lo que permitiría la inducción de HO-1 [Mayer y col., 2003; Maines, 2005a]. La BVR puede también regular la expresión del gen *ho-1* por unión de metaloporfirinas a un sitio distinto del de unión de la biliverdina y dependiendo del metal quelado en el anillo de la profirina, la metaloporfirina resultante puede activar o inhibir a la BVR y así controlar al gen *ho-1* [Maines, 2005a].

Regulación del gen ho-1 por hemo

Los factores de transcripción AP-1/2 y NF- κ B juegan un rol crucial en la inducción de la expresión y actividad de HO-1 en respuesta a hemo y hemina [Lavrovsky y col., 1994]. La inducción de HO-1 mediada por AP-1 puede ser atenuada por antioxidantes [Camhi y col., 1998]. Aunque el MARE localizado en el promotor de *ho-1* inicialmente se consideró que media la respuesta a estrés por interacción con el factor de transcripción AP-1, la misma secuencia interacciona con otro factor de transcripción, Nrf2 (**Fig. 7**). Este último juega un rol esencial

en la expresión de proteínas detoxificantes de fase II, antioxidantes y genes inducibles por estrés [Alam y col., 1999; Alam y col., 2000], mediando su expresión [Alam y col., 2004] (**Fig. 7**). En el citoplasma Nrf2 forma un complejo inactivo con la proteína asociada kelch-like ECH-1 (Keap1) [Kwak y col., 2004] o con Bach1 que es un represor transcripcional que responde a hemo en mamíferos [Ogawa y col., 2001]; su disociación le permite translocarse al núcleo. Después de que se forma un heterodímero con la pequeña proteína Maf, Nrf2 activo se une a elementos *cis* que tienen secuencias StRE, MARE o ARE induciendo a *ho-1*. Bach1 es crítico en la regulación del gen *ho-1* ya que se comprobó que *in vitro* se une a hemo con alta afinidad ($KD = 140$ nM para Bach1 recombinante) inhibiendo su propia unión al ADN (**Fig. 7**). Estos hallazgos sugieren un modelo simple para la inducción de la expresión de HO-1 que se resume en lo siguiente: *la inactivación de la represión del gen ho-1 es mediada por Bach1 en presencia de niveles aumentados de hemo* [Ogawa y col., 2001]. El grupo de Igarashi y col. [Dohi y col., 2006] demostró que *ho-1* en fibroblastos NIH3T3 no estaba reprimido por hipoacetilación del micro ambiente de la cromatina, sino que existe en un estado preactivado ya que las histonas H3 estaban hiperacetiladas en el enhancer que contiene StRE y las regiones promotoras proximales independientemente de la actividad del gen. Por el contrario, la exposición a hemo indujo hiperacetilación e hipermetilación *de novo* de las histonas H3 en la región transcripta. Por lo tanto, el nivel de represión basal de la transcripción es mediado por Bach1 y se observó tanto *in vitro* como *in vivo*, que el hemo promueve el desplazamiento de Bach1 de los enhancers de *ho-1*, resultando en desrepresión del gen [Dohi y col., 2006].

La actividad del represor Bach1 es dominante sobre la función activadora de Nrf2, manteniendo niveles bajos de *ho-1* en condiciones normales [Sun y col., 2002]. La expresión de HO-1 y Bach1 es inversamente regulada [Kitamuro y col., 2003]. Aunque HO-1 es reprimida por los heterodímeros Bach1/Maf, es activada por Nrf2/Maf [Suzuki y col., 2003], por lo que la regulación de la expresión de genes mediada por ARE está determinada por un único balance entre Bach1 y Nrf2 dentro del núcleo [Dhakshinamoorthy y col., 2005].

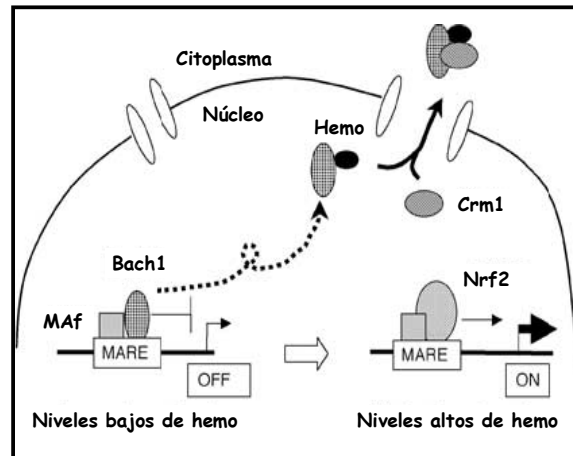


Figura 7. Regulación de *ho-1* por hemo *in vivo* (adaptado de Suzuki y col. [2004]).

La figura describe la regulación de *ho-1* por Bach1 y hemo. El heterodímero Bach-1/Maf ocupa los sitios MARE y reprime la transcripción bajo condiciones normales. Un aumento en los niveles de hemo desreprime la represión mediada por Bach1 a través de la inhibición de su actividad de unión al ADN y subsiguiente exportación nuclear dependiente del exportador nuclear Crm1, dejando los sitios MAREs disponibles para ser activados por complejos Nrf2/Maf.

Productos metabólicos de HO-1

La **Fig. 8** nos muestra los tres productos metabólicos producidos por la actividad de la HO-1 y los efectos biológicos y funciones asociadas a los mismos. Muchos de estos efectos biológicos involucran la señalización por guanilato ciclasa soluble-3',5' guanosina mono fosfato (GCs-GMPc) [Ryter y col., 2002] o la regulación por actividades de MAPKs [Elbirt y Bonkovsky, 1999], con variación aparente entre tejidos y sistemas modelos.

La expresión de HO-1 ha estado asociada con citoprotección en varios modelos *in vitro* e *in vivo* [Ryter y col., 2002] y es probable que represente un instrumento intermediario para la citoprotección disparando río abajo otros procesos adaptativos [Ryter y col., 2004]. Los mecanismos por los cuales se produce esta citoprotección están siendo intensamente estudiados.

La generación de bilirrubina se ha asociado con citoprotección en diversos modelos debido a su potente actividad antioxidante, protegiendo a las células

frente a un exceso de H_2O_2 de hasta 10.000 veces. [Stocker y col., 1987; Baranano y col., 2002]. La depleción de BVR, con RNAi, produjo un aumento de ROS en los tejidos y provocó apoptosis [Baranano y col., 2002].

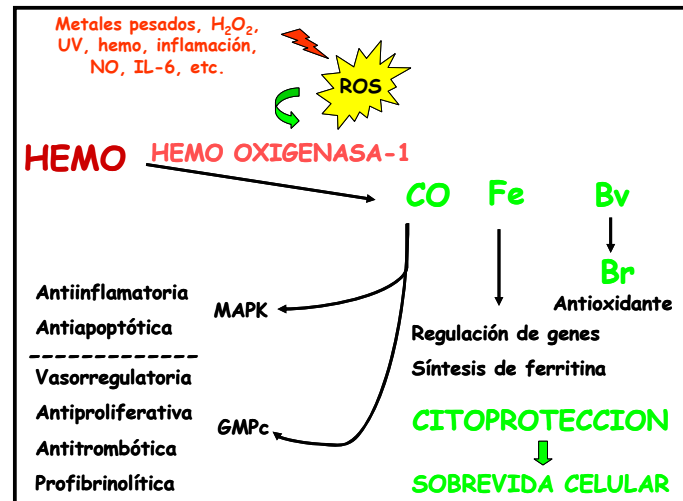


Figura 8. Consecuencias funcionales de HO-1 en los procesos fisiológicos (adaptado de Ryter y col. [2004]).

En cuanto al hierro, la elevación transiente intracelular, dispara la síntesis de ferritina, que es la proteína principal en el almacenaje del Fe en las células de mamíferos. La ferritina secuestra al Fe, y sirve como un citoprotector secundario río abajo de la actividad de HO-1 [Vile y Tyrrell, 1993; Gonzales y col., 2002; Juang, 2004; Nie y col., 2006].

Muchas funciones biológicas de HO son conferidas al CO; la citoprotección contra estrés oxidativo [Wang y col., 2007], la regulación del tono vascular [Brune y Ullrich, 1987; Morita y col., 1995; Zhang y col., 2001], la neurotransmisión [Verma y col., 1993], el potencial anti inflamatorio [Otterbein y col., 2000; Wagener y col., 2003], el anti apoptótico [Petrache y col., 2000; Brouard y col., 2002; Gunther y col., 2002; Zhang y col., 2003; Li Volti y col., 2004; Kim y col., 2006; Ryter y col., 2007] y el anti proliferativo [Morita y col., 1995; Ryter y col., 2002; Song y col., 2002; Pae y col., 2004] involucran al sistema GCs-GMPc o la regulación de la actividad de p38 MAPKs y varía de acuerdo al tejido o sistema

modelo. El rol del CO en la señalización emergió de observaciones en células del músculo liso vascular (VSMCs). En dichas células el CO derivado de HO pudo estimular la producción GCs para producir GMPc e inhibió su proliferación [Ryter y col., 2002; Kim y col., 2004; Kim y col., 2006].

Enfermedades asociadas con alteraciones en la expresión de HO-1

El rol crítico de esta enzima surge a partir del único caso reportado de deficiencia de HO-1 en un niño que fallece a edad temprana. La ausencia total de producción de HO-1 produjo retardo severo del crecimiento, coagulación anormal, persistente daño endotelial, baja bilirrubina, anemia hemolítica persistente, etc. [Yachie y col., 1999; Kawashima y col., 2002]. Por lo tanto, es probable que mutaciones en el gen de *ho-1* sean letales en el útero. La madre de este niño había experimentado dos muertes fetales intrauterinas con anterioridad [Yachie y col., 1999].

Algunas enfermedades/condiciones están asociadas con la expresión de HO-1 [Wagener y col., 2003] como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer [Smith y col., 1994], el asma [Horvath y col., 1998], la aterosclerosis [Siow y col., 1999], la diabetes [Cosso y col., 2001], las alteraciones en la homeostasis del Fe [Poss y Tonegawa, 1997], la inflamación de la cámara corneal [Laniado-Schwartzman y col., 1997], la pancreatitis aguda [Fu y col., 1997], el rechazo al trasplante [Hancock, 1998], etc.

La importancia biológica de la inducibilidad de HO-1 se ha demostrado además por las anormalidades fisiológicas observadas en ratones *ho-1^{-/-}*, los cuales presentaron importantes deficiencias en el perfil inmunológico respecto a los animales *ho-1^{+/+}* y una tendencia pro-inflamatoria asociada a la deficiencia de HO-1 [Kapturczak y col., 2004].

HO-1 y cáncer

La proteína HO-1 y su fuerte respuesta adaptativa a diferentes estímulos de estrés sugiere un importante rol distinto de la degradación del hemo [Willis y

col., 1996]. La función que juega esta proteína en la patología de los tejidos está determinada por un delicado balance entre el daño y la acción protectora de los productos finales generados durante el catabolismo del hemo [Dong y col., 2000].

El CO derivado de HO fue formalmente considerado como un producto de eliminación catabólica sin significado fisiológico. Sin embargo, concentraciones elevadas del mismo causan hipoxia del tejido, por competir con los sitios de unión al oxígeno en la hemoglobina [Von Burg, 1999]. La limitación del oxígeno es central para controlar la neovascularización, el metabolismo de la glucosa, la supervivencia y la extensión del tumor [Pouyssegur y col., 2006].

Suttner y Dennery [1999] sugirieron que bajos niveles de expresión de HO-1 son protectores, un aumento moderado no modifica el daño celular causado por hiperoxia, mientras que altos niveles de expresión incrementan el daño.

La sobre expresión de HO-1 ha sido observada en células premalignas y malignas en humanos y animales [Maines y Abrahamsson, 1996; Jasani y Schmid, 1997]. Por otro lado en un modelo de adenocarcinoma de esófago de rata, el aumento de HO-1 producía altos niveles de Fe, aumentando la inflamación y la producción de especies reactivas de nitrógeno, las cuales a su vez contribuían a la carcinogénesis [Chen y col., 2000]. La respuesta angiogénica de las células endoteliales a la sobre expresión del gen *ho-1* proporciona una evidencia directa de que la forma inducible de HO-1, representa un importante mecanismo adaptativo para moderar la severidad del daño celular producido en los sitios de la reacción inflamatoria, participando en la regulación de la activación de las células endoteliales, la proliferación y la angiogénesis [Deramaudt y col., 1998].

HO-1 juega un rol importante en el crecimiento tumoral ya que el gen de *ho1* contiene secuencias regulatorias para los factores de transcripción ETS-1 (homólogo 1 del ETS), FLI-1 ("friend leukemia Integration 1") y ERG, cuyas actividades están asociadas con proliferación celular, diferenciación de las células endoteliales y transducción de señales de metaloproteinasas de matriz celular [Deramaudt y col., 1999]. Se ha reportado que la inducción de la expresión de HO-1 aumenta el crecimiento desplazando el balance proliferación/apoptosis e induce

la angiogénesis a través del aumento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células endoteliales y células tumorales [Deramandt y col., 1998; Malaguarnera y col., 2002; Sunamura y col., 2003]. Estos fenotipos son ventajosos para la progresión del tumor y la supervivencia. HO-1 aumenta la expresión de VEGF, la formación de capilares vasculares y el flujo sanguíneo en tejidos isquémicos y en tumores [Tozer y col., 1998; Dulak y col., 2004]. También se detectó inducción HO-1 en tumores de cerebro [Hara y col., 1996; Takahashi y col., 1996]. En muestras de glioma humano la expresión del ARNm de HO-1 se correlacionó con infiltración de macrófagos e incrementó la densidad vascular. Además, se observó por inmunohistoquímica que los macrófagos infiltrantes se teñían positivamente con el anticuerpo anti HO-1 [Nishie y col., 1999].

Sasaki y col. [2005] encontraron sobre expresión de HO-1 en células de cáncer de riñón, vejiga y de próstata (DU145).

HO-1 es una molécula clave en reducir la citotoxicidad. Diferentes cánceres humanos expresan altos niveles de HO-1, lo cual podría proveerlos de una ventaja para el crecimiento [Otterbein y col., 2003].

El aumento en el nivel de HO-1 y p21 redujo marcadamente la sensibilidad al estímulo apoptótico de las células de carcinoma de tiroides papilar [Chen y col., 2004] y células de cáncer gástrico, siendo en este último caso independiente del estado de p53 [Liu y col., 2004].

En leucemia mieloide crónica la expresión de HO-1 se volvió constitutiva y los niveles elevados de HO-1 se asociaron con crecimiento neoplásico, por ser HO-1 un factor de supervivencia dependiente del gen de fusión BCR-ABL [Mayerhofer y col., 2004]. En células de carcinoma de colon (Caco-2), HO-1 también podría ser un factor de supervivencia, dado que inhibiría la apoptosis inducida por deprivación de factores de crecimiento, vía la activación del camino de Akt [Busserolles y col., 2006].

Además, la sobre expresión de HO-1 potenció la agresividad del cáncer de melanoma murino, ya que aumentó la proliferación celular, la resistencia al estrés oxidativo y el potencial metastático y angiogénico tanto *in vitro* como *in vivo*. El

aumento de la actividad de HO-1, se vio reflejado en un acortamiento en la supervivencia de los ratones transplantados con células de cáncer de melanoma B16-HO-1. El análisis histológico de estos melanomas mostró que formaban tumores más compactos y con mayor densidad celular [Was y col., 2006].

La resistencia a las quimioterapias prooxidantes en células K562, MCF-7, y SKOV-3, se relacionó con la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes claves como HO-1 [Kalinina y col., 2006].

Por análisis inmunohistoquímico se observó en adenomas pleomórficos paratiroides que HO-1 estaba sobre expresada en comparación a los ductos salivares normales [Lo y col., 2005].

La sobre expresión de la isoforma inducible de HO y el aumento de su actividad fue encontrado en diversos tumores tales como carcinoma de células renales humanas [Goodman y col., 1997] y linfosarcomas, [Schacter y Kurz, 1986]. En gliomas y melanomas humanos HO-1 está relacionado con la angiogénesis [Nishie y col., 1999; Torisu-Itakura y col., 2000], al igual que en un modelo experimental de carcinoma pancreático de ratón [Sunamura y col., 2003]. En astrocitomas se observó que la expresión del ARNm de HO-1 en células CD4(+) CD25(+) fue mayor en tumores de grado IV que en los de grado II y III, y que las células-T regulatorias (células que suprimen la activación del sistema inmune y mantienen su homeostasis) que infiltraban al tumor también mostraban tinción positiva para HO-1 [Xie y Huang, 2003; El Andaloussi y Lesniak, 2007].

En un modelo experimental de hepatoma se pudo observar que HO-1 puede funcionar como defensa antiapoptótica del tumor, teniendo un efecto protector y benéfico para las células tumorales contra el estrés oxidativo producido en exceso durante el crecimiento del tumor *in vivo* [Tanaka y col., 2003]. Además, HO-1 contribuye vía sus efectos anti oxidantes y anti proliferativos al crecimiento rápido de los tumores sólidos de rata [Doi y col., 1999; Tanaka y col., 2003]. La acción antiapoptótica de HO-1 se cree que está mediada por múltiples mecanismos, tales como la disminución en los niveles intracelulares de pro oxidantes y al aumento en los niveles de bilirrubina y CO. Así, la acción anti apoptótica ejercida

por el CO se asoció con la inhibición de la liberación del citocromo c mitocondrial y la inhibición de la expresión de la proteína supresora tumoral p53. [Liu y col., 2002].

La inhibición de HO-1 redujo y/o retrasó el crecimiento de los tumores en modelos experimentales, tales como el de hepatoma de rata y el cáncer pancreático de ratón [Doi y col., 1999; Fang y col., 2003; Sunamura y col., 2003]. El silenciamiento de la expresión de HO-1 en células de cáncer de páncreas condujo a una pronunciada inhibición del crecimiento. Esto resultó en una significativa sensibilidad a la radioterapia y la quimioterapia [Berberat y col., 2005]. Por otro lado, la inhibición de HO-1 provocó efectos antitumorales relevantes en cáncer derivado de células LL/2 de pulmón en ratones C57BL [Hirai y col., 2007]. Otros autores también han demostrado, en un modelo experimental, que silenciando la expresión del gen *ho-1* con una pequeña horquilla de RNA o mediante inhibición química de la actividad enzimática se contrarrestó tanto la sobrevida, inducida por la proteína oncogénica G acoplada al receptor en sarcoma de Kaposi asociado a herpes virus (KSHV-GPCR) como la proliferación, la transformación y la expresión de la isoforma A de VEGF [Marinissen y col., 2006].

Por otro lado se ha demostrado que un aumento en la expresión de HO-1 en ratones con adenocarcinomas y tratados con terapia fotodinámica, resultó en una re incidencia más rápida del tumor [Nowis y col., 2006].

En la mayoría de los tipos tumorales la sobre expresión de HO-1 ha mostrado tener efectos protectores en cáncer por lo cual podría ser un efectivo blanco para terapia anti cáncer. Es más, en un estudio reciente que empleó la técnica de espectroscopia de masa diferencial se halló un péptido (APLLRWVL, masa isotópica [M1H]: 967.6) proveniente de la proteína HO-1 en biopsias de cánceres renales. Se ha propuesto que este epítipo de células T identificado diferencialmente podría ser utilizado como blanco para inmunoterapia. Además el análisis inmunohistoquímico de estas muestras de cánceres renales reveló sobre expresión de HO-1 en tejido tumoral, mientras la proteína no fue detectada en su contraparte de tejido benigno [Flad y col., 2006].

Sin embargo debe tenerse en cuenta que existen algunos reportes contradictorios acerca de la sobre expresión de HO-1 en células tumorales. Estudios *in vivo* han propuesto que la sobre expresión de HO-1 es un marcador útil para identificar pacientes con bajo riesgo de metástasis en carcinoma oral de células escamosas [Tsuji y col., 1999] y en carcinoma de lengua [Yanagawa y col., 2004], de modo que el perfil de expresión de HO-1 podría ser útil para reducir el número de cirugías innecesarias. En células de cáncer de mama tanto humanas (MCF-7, T47D) como de rata (NMU y 13762) se propuso que la sobre expresión de HO-1 tendría función anti tumoral, medida por mecanismos antioxidantes [Hill y col., 2005]. En un modelo experimental de hepatocarcinogénesis química murina, la disminución de la expresión de HO-1 se asoció con progresión maligna [Caballero y col., 2004; Sacca y col., 2004; Castronuovo y col., 2006].

Otros estudios han observado una asociación entre los polimorfismos del gen *ho-1* y la incidencia de cáncer. Se identificaron repeticiones (GT)_n en el promotor de *ho-1*. Se demostró que estos micro satélites son altamente polimórficos y que (GT)_n más cortas estaban asociadas con un alta actividad de HO-1 y un riesgo mayor de progresión de melanomas [Okamoto y col., 2006]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los efectos de la activación de HO-1 pueden ser diferentes en los estadios de la tumorigénesis comparados con los de la progresión del tumor. En carcinoma de pulmón [Kikuchi y col., 2005a] y carcinoma oral de células escamosas [Chang y col., 2004] se ha sugerido que la alta expresión HO-1 puede ser beneficiosa para el paciente y puede disminuir la incidencia de carcinogénesis.

Resumiendo, el rol citoprotector del sistema HO depende del medio celular: el aumento de la actividad de HO es beneficiosa o perjudicial dependiendo de cada tejido. Esto explicaría los reportes contradictorios sobre este tema [Maines y Gibbs, 2005].

HO-1 y cáncer de próstata

El hemo es el grupo prostético de varias proteínas hémicas, como el citocromo P450, el cual está relacionado con la esteroidogénesis en la próstata. Una función establecida para HO-1 es su rol en la regulación de los niveles celulares del P450, incluyendo las isoformas involucradas en la esteroidogénesis [Maines, 1992]. Se ha demostrado que existe una relación inversa entre la actividad de HO-1 y el nivel de citocromo P450 en testículo [Maines y col., 1982; Maines y Jollie, 1984]. Maines y col. [1996] han propuesto que un aumento en la actividad de HO-1 podría producir una disminución en la producción de DHT, como resultado de la degradación de hemo. Si el tejido maligno se vuelve independiente de andrógenos, entonces la potencial ventaja de la activación de HO-1 se perdería [Maines y Abrahamsson, 1996]. Además, el hierro modula la expresión de varios genes, incluyendo HO-1 [Maines y Kappas, 1977] y los receptores de transferrina [Lok y Loh, 1998]. La proliferación de las células del carcinoma prostático es estimulada por transferrina, una fuente de Fe para el crecimiento celular [Rossi y Zetter, 1992]. Por lo tanto en el contexto de la actividad catalítica de HO-1, un aumento de su expresión es consistente con un rol de esta proteína en la proliferación celular y la transformación maligna [Maines y Abrahamsson, 1996].

Factores relacionados a HO-1 y relevantes en cáncer de próstata

Recientemente se ha reportado que el evento genético más frecuente asociado al PCa es la fusión de la región 5' no traducida del gen regulado por andrógenos *TMPRSS2* a los miembros de la familia de los factores de transcripción oncogénicos ETS y *ERG*, comúnmente sobre expresados en esta enfermedad [Tomlins y col., 2005]. Se ha observado que la consistencia y magnitud de la expresión de *ERG* en PCa es única y que la sobre expresión tanto de *ERG* como de ETS juegan un rol en los estadios tempranos del PCa [Rostad y col., 2007]. Considerando que el gen *ho-1* contiene secuencias regulatorias para ETS y *ERG* (como describimos previamente) resulta imperante establecer el rol de HO-1 en esta malignidad.

El camino de señalización de TGF- β tiene un rol importante en regular el epitelio normal de la próstata, inhibir la proliferación, diferenciación y la apoptosis inducida por privación de andrógenos y la apoptosis independiente de andrógenos [Turley y col., 2007]. La sobre expresión de TGF- β y la disminución de la expresión de los receptores de TGF- β en PCa podría sugerir un mecanismo en las células de próstata para escapar de los efectos inhibitorios del crecimiento de TGF- β conduciendo a un fenotipo más maligno [Cardillo y col., 2000]. Durante la formación del PCa, la mayoría de las células se vuelven resistentes a estos efectos homeostáticos del TGF- β [Turley y col., 2007]. Por otro lado se ha demostrado que el TGF- β 1 juega un rol protector en células humanas epiteliales pulmonares y epiteliales renales, atenuando el daño celular y manteniendo la homeostasis del tejido a través de la inducción de proteínas citoprotectoras tales como HO-1 [Kutty y col., 1994; Hill-Kapturczak y col., 2000; Ning y col., 2002]. Se sabe poco sobre el mecanismo por el cual TGF- β 1 regula la inducción de la proteína HO-1. Recientemente se ha demostrado que TGF- β 1 induce la expresión de la proteína HO-1 vía activación de PI3K/Akt dependiente de la fosforilación IKK α / β , fosforilación de p65 y activación de NF- κ B en células pulmonares A549 [Lin y col., 2007]. Además, NF- κ B juega un rol crítico en la regulación del aumento de la expresión del gen *ho-1* dependiente del envejecimiento en el hígado de rata [Lavrovsky y col., 2000]. Se ha sugerido que la inducción de HO-1 podía modular la producción de componentes de la matriz extracelular y que dicha inducción era mediada por TGF- β [Mark y col., 2005]. En Pca aún no se ha estudiado la relación entre TGF- β y HO-1. Por lo tanto el hecho de investigar el rol de HO-1 en esta enfermedad conducirá a un mejor entendimiento de la biología de este tumor.

Es importante resaltar un estudio reciente realizado sobre HO-1 y su influencia sobre la osteoclastogénesis y la pérdida ósea por inflamación en humanos. Zwerina y col. [Zwerina y col., 2005] investigaron los efectos de la inducción de HO-1 en la formación de osteoclastos in vitro e in vivo. La inducción de HO-1 por hemina previno la diferenciación de los precursores de osteoclastos sin afectar a las células maduras, y las propiedades osteoclastogénicas fueron

mediadas por regulación negativa de diversos factores entre ellos RANK. Por lo tanto se comprobó que HO-1 regula positivamente el balance neto de la remodelación del hueso. Considerando la importancia de la reacción ósea en la progresión del PCa, es importante conocer el estado de expresión de HO-1 en pacientes con esta patología.

Teniendo en cuenta todos los antecedentes descriptos, consideramos relevante analizar el rol y la funcionalidad de HO-1 en PCa.

CRECIMIENTO CELULAR

De acuerdo a la teoría celular establecida por el biólogo alemán Rudolf Virchoff en el siglo XIX, "las células sólo provienen de células". Las células existentes se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular; en el cual la célula aumenta su tamaño y el número de componentes intracelulares (proteínas y organelas), duplica su material genético y finalmente se divide.

Ciclo celular

El ciclo celular es un regulador crítico tanto de los procesos de proliferación celular y crecimiento como de la división celular después del daño al ADN.

Las fases del ciclo celular y los puntos de chequeo

En las células somáticas el ciclo celular está dividido en cuatro fases. Durante dos de estas fases, las células ejecutan los eventos básicos en la división celular: la generación de una copia fiel y simple de su material genético (fase de síntesis o S) y la partición de todos los componentes celulares entre dos células hijas idénticas (mitosis o fase M). Entre estas fases existen otras dos que representan períodos "*gap*" (G1 y G2) de duración variable, durante los cuales las células se auto preparan para completar satisfactoriamente las fases S y M.

El punto de restricción se encuentra casi al final de G1, se conoce así puesto que si la célula lo pasa se encuentra "comprometida" irreversiblemente a entrar al ciclo celular, independientemente de lo que suceda en el exterior.

Cuando las células cesan su proliferación debido a ciertas señales antimitogénicas o a la ausencia de señales mitogénicas apropiadas, salen del ciclo y entran en un estado de no división o quiescencia denominado G0. La fase G0, es una fase activa, en la cual tienen lugar las funciones celulares y el crecimiento. Esta fase está estrictamente regulada porque la alternativa de división

descontrolada sin crecimiento celular conduciría a células más pequeñas con cada división [Schwartz y Shah, 2005].

La transición del estado quiescente (G0) a proliferación celular, es controlada por los "puntos de chequeo" para asegurar el orden de los eventos en el ciclo celular; estos puntos permiten el arresto de la progresión del ciclo para evaluar las señales de crecimiento extracelulares, el tamaño de la célula [Park y Lee, 2003] y la integridad del ADN, mediante la activación de los mecanismos de reparación para asegurar la fidelidad del transcripto génico [Hartwell y Weinert, 1989; Elledge, 1996]. Después de pasar por estos puntos de chequeo, las células irreversiblemente están comprometidas a la siguiente fase [Park y Lee, 2003].

Ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas

La progresión a través del ciclo celular está promovida por un número de kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) [Vermeulen y col., 2003]. La regulación positiva de la actividad de las CDKs ocurre a través de la asociación con una segunda subunidad, la ciclina y por fosforilación mediada por una kinasa activadora de CDK (CAK) [Park y Lee, 2003]. Las ciclinas son producidas en cada una de las fases del ciclo celular y forman un complejo con su CDK asociada. Los niveles de las ciclinas activadas varían en las diferentes fases y definen la posición relativa de la célula dentro del ciclo celular [Vermeulen y col., 2003] (**Fig. 9**).

Las primeras ciclinas cuya expresión es inducida, cuando las células en G0 son estimuladas a entrar en el ciclo celular, son las del tipo D. Existen tres isoformas de la ciclina D (ciclina D1-D3) que interaccionan con CDK2, CDK4 y CDK6; esta interacción conduce a que las células progresen a través de la fase G1. [Vermeulen y col., 2003; Schwartz y Shah, 2005] (**Fig. 9**). El complejo de la ciclina E con CDK2 se activa en la transición de las fases G1/S y dirige la entrada hacia la fase S [Cordon-Cardo, 1995]. La entrada en la fase G1 del ciclo celular está gobernada por el punto de restricción- un punto de transición - más allá del cual la progresión a través del ciclo celular es independiente de estímulos externos, tales como exposición a nutrientes o activación de mitógenos. Este punto de restricción

se cree que divide a la fase G1 del ciclo celular en una etapa temprana y una tardía (**Fig. 9**). El producto del gen supresor retinoblastoma (Rb) gobierna la transición G1/S [Weinberg, 1995]. En su estado hipofosforilado (activo) el Rb compleja a un grupo de factores de transcripción conocidos como E2F. La actividad de Rb está modulada por la fosforilación secuencial por los complejos CDK4-6/ciclina D y CDK2/ciclina E [Malumbres y Barbacid, 2001]. Cuando el Rb se hiperfosforila libera completamente a los factores de transcripción E2F, dando por resultado la activación de numerosas proteínas de la fase S (**Fig. 10**).

En la fase S temprana, las ciclinas D y E son blanco de ubiquitinación para la degradación por el proteasoma [Elledge y Harper, 1998]. La progresión de la fase S es dirigida por el complejo ciclina A/CDK2 con la producción de enzimas y proteínas involucradas en la síntesis del ADN. Durante la fase S tardía y a través de G2 las células se preparan para la mitosis y aumentan los niveles de ciclinas A y B (**Fig. 10**). El complejo ciclina A/CDK1 es importante en G2. Recientemente se ha descrito un punto de chequeo de la fase S, llamado punto de chequeo de la replicación [Zhou y Elledge, 2000; Jeggo y Lobrich, 2006]. Este monitorea la progresión a través de la fase S, retarda la tasa de síntesis del ADN e involucra la activación de las kinasas ATM y ATR con la subsiguiente activación de Chk1 y Chk2.

La proteína CDK1 es el único miembro no redundante de la familia de CDKs. Está involucrada en la transición G2/M. Además, el complejo CDK1/ciclina B es necesario para que la mitosis se lleve a cabo [Maddika y col., 2007].

Los inhibidores del ciclo celular

Existen proteínas inhibidoras del ciclo celular (CDKIs) que sirven como reguladores negativos del mismo e impiden que la célula prosiga a la fase siguiente del ciclo celular. Hay dos familias de inhibidores de las CDKs. A la familia INK4 pertenecen los inhibidores p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} y p19^{Ink4} y a la familia de inhibidores de proteínas kinasas Cip/Kip pertenecen p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} [Park y Lee, 2003; Schwartz y Shah, 2005] (**Fig. 9**).

Los miembros de la familia de inhibidores Cip/Kip pueden inhibir cada uno de los complejos ciclina/CDK esenciales para la progresión de la fase G1 y la entrada a la fase S. Estas proteínas también pueden regular la transición G2/M [Senderowicz, 2002].

Bajos niveles de p21 y p27 son necesarios para una progresión normal del ciclo celular, mientras que niveles altos son requeridos para inducir caminos inhibitorios del crecimiento [Sgambato y col., 2000]. La proteína p21 (más que p27) a bajos niveles estequiométricos actúa como regulador positivo de los complejos ciclina D/CDK4-6 [Barnouin y col., 2002].

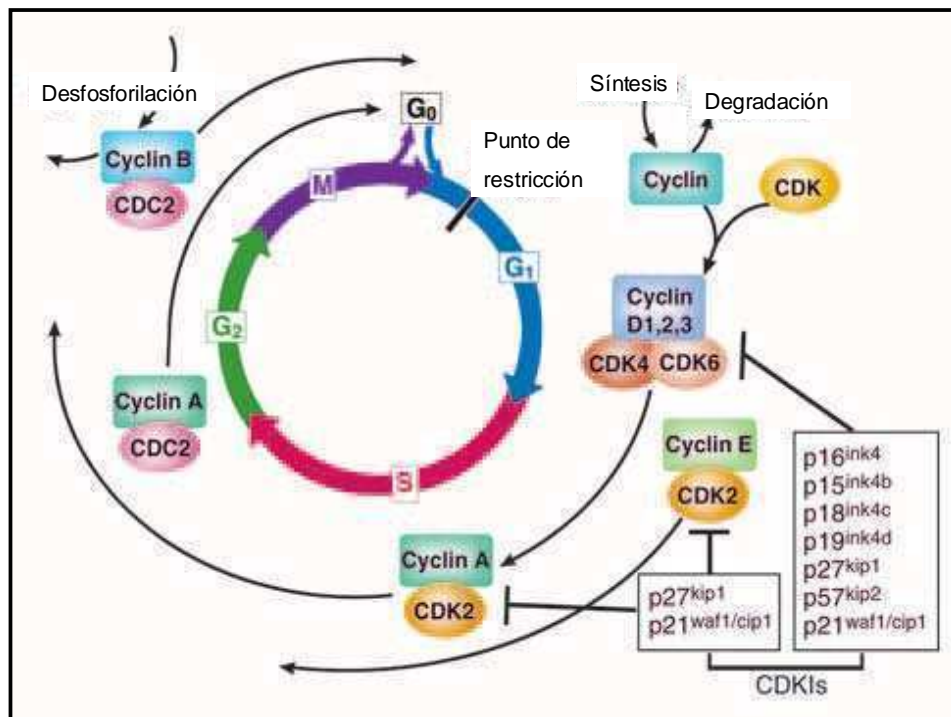


Figura 9. El ciclo celular (adaptado de Schwartz y Shah [Schwartz y Shah, 2005]) El ciclo celular está dividido en cuatro fases (G₁, S, G₂, M). La progresión a través del ciclo está promovida por las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales están reguladas positivamente por las ciclinas y negativamente por los inhibidores de las CDKs (CKIs). A partir del punto de restricción en G₁ las células progresan a través del ciclo celular independiente de estímulos externos.

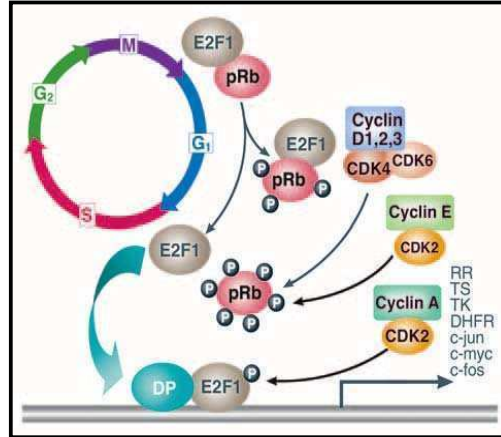


Figura 10. Transición G1/S y la proteína Rb [Schwartz y Shah, 2005]

La proteína Rb hipofosforilada forma un complejo con el factor de transcripción E2F1. CDK2, CDK4 y CDK6 fosforila a Rb, E2F1 es liberado, se une al ADN e induce la transcripción de genes. La posterior fosforilación de E2F por ciclina A-CDK2 conduce a su degradación.

Proteínas reguladoras del ciclo celular y su relación con el cáncer

Algún tipo de desregulación y/o cambios mutacionales en la expresión de los genes que controlan el ciclo celular, como la desaparición del punto de chequeo R en la transición G1/S, son las principales causas de la aparición de tumores humanos. El daño al ADN puede activar el arresto del ciclo e incluso la cascada apoptótica, conduciendo a la muerte celular [Malumbres y col., 2003].

Las ciclinas y su relación con el cáncer de próstata

En PCa, Kallakury y col. [1997] observaron que la ciclina D1 estaba sobre expresada en pacientes con alto grado de Gleason. Trabajos posteriores demostraron que la sobre expresión de ciclina D1 estaba asociada con un índice proliferativo alto, pudiendo representar un evento oncogénico en el PCa metastásico al hueso [Drobnjak y col., 2000]. Además, se ha reportado que alta expresión de ciclina D1, Ki-67 y una alta tasa de apoptosis estaban relacionados con fenotipos malignos de PCa [Aaltomaa y col., 2006].

La ciclina D1 regula múltiples factores de transcripción adicionales independientes de CDK4 y fuera de su rol en el ciclo celular, pero el mecanismo por el cual la ciclina D1 ejerce control sobre la acción de estos factores aún no está definido [Petre-Draviam y col., 2005]. La ciclina D1 también funciona como un fuerte co-represor del RA con amplia especificidad para la ablación de la transactivación dependiente de ligando, interaccionando directamente e inhibiendo su actividad. Tiene un rol crítico en regular el crecimiento de la próstata dependiente de andrógenos [Petre-Draviam y col., 2003]. Sin embargo, se ha demostrado que la acción de la ciclina D1 se encuentra conservada en varias líneas celulares tumorales, inhibiendo incluso la activación de genes dependientes del RA, en líneas de adenocarcinoma prostático independiente de andrógenos [Petre-Draviam y col., 2003]. La transactivación del RA es regulada en una manera dependiente del ciclo celular, donde en G1/S la actividad del RA está significativamente disminuida por los niveles aumentados de ciclina D1 [Martinez y Danielsen, 2002].

Así, las propiedades tumorigénicas de la ciclina D1 están por lo tanto relacionadas a su rol como regulador transcripcional [Petre-Draviam y col., 2005].

En cuanto a la expresión de la proteína ciclina E, se detectaron niveles altos en carcinomas malignos de próstata y mama [Erlandsson y col., 2003]. Además, se ha reportado que la sobre expresión de ciclina E mediaría la transformación maligna equiparando la actividad constitutivamente alta de CDK2 y anulando los mecanismos de control en el punto de restricción R [Geisen y Moroy, 2002]. La periodicidad de la ciclina E no está únicamente determinada a nivel transcripcional, sino también mantenida por regulación post traduccional a través de la proteólisis dependiente de ubiquitinación [Clurman y col., 1996]. La sobre expresión ectópica o constitutiva de ciclina E, pero no de ciclina D1 o A, puede conducir a una progresión acelerada de la fase G1 y a la inestabilidad cromosómica en ciertos tipos de células malignas [Mazumder y col., 2004]. El aumento de la expresión al tiempo apropiado y la amplitud de la misma parece ser importante, ya que niveles elevados de esta proteína se han asociado con la malignidad.

Durante la mitosis es vital la unión del huso bipolar con el centrosoma a fin de preservar la fidelidad genética. En los tumores se ha observado anomalías del centrosoma provocando inestabilidad genética. La maduración del centrosoma ocurre con la duplicación del centríolo en G1 y es disparado por la actividad de CDK2/ciclina E y CDK2/ciclina D.

Por otro lado, la expresión aberrante de ciclina E en tumores puede contribuir a la persistente activación de la función del RA y este efecto no parece estar mediado por la formación del complejo ciclina E-CDK2. La activación inapropiada del RA por la ciclina E puede marcar el desarrollo de la resistencia del PCa durante la terapia de ablación de andrógenos [Yamamoto y col., 2000].

Los inhibidores y su relación con el cáncer de próstata

La proteína p27 es un gen supresor tumoral putativo, regulador de la resistencia a drogas en tumores sólidos [St Croix B. y col., 1996; Lloyd y col., 1999]. Otros estudios han sugerido que las proteínas p21 y p27 además tendrían roles adicionales no relacionados con sus funciones como inhibidores. Podrían actuar como potenciales factores de ensamblaje, como reguladores de la apoptosis, de la diferenciación celular, de la migración, y como cofactores transcripcionales [Sgambato y col., 2000; Coqueret, 2003]. Estas funciones se desprenden de las distintas localizaciones celulares y los diferentes blancos, presentes tanto en el citoplasma como en el núcleo. La proteína p27 como regulador de la apoptosis, coordinaría el ciclo celular y los programas de muerte celular para proteger a las células de los insultos externos que podrían desencadenar excesiva proliferación celular y apoptosis [Sgambato y col., 2000]. Se ha observado que p27 juega un rol importante en el pasaje de proliferación a diferenciación de las células precursoras de varios linajes celulares y que la pérdida de p27 está asociada con fenotipos pobremente diferenciados en varios tumores, por lo que se ha sugerido que su potenciación debe ser una estrategia útil en el tratamiento del cáncer promoviendo la transición de las células tumorales a fenotipos más diferenciados [Sgambato y col., 2000]. También se ha propuesto que esta proteína media los

efectos dependientes de la adhesión sobre la progresión del ciclo celular. Un aumento en el nivel de p27 contribuiría al arresto del ciclo celular cuando las células normales están impedidas de adherirse a su sustrato [Sgambato y col., 2000]. Se ha observado que niveles incrementados de p27 en célula tumorales pueden estar relacionados con un cambio en la forma celular o con cambios en la capacidad de responder a señales extracelulares [Sgambato y col., 2000]. Los tumores con elevados niveles de p27, ciclina E y D1 tendrían un mejor pronóstico que los tumores en los cuales la sobre expresión de estas ciclinas no está asociada con un aumento concomitante de la expresión de p27 [Sgambato y col., 2000].

Entre las funciones adicionales asignadas a p27 se encuentra su participación en la diferenciación. Estudios realizados en ratones deficientes en p27 han demostrado que esta proteína ejerce un rol clave en osteoblastos promoviendo la transición de proliferación a diferenciación [Drissi y col., 1999]. Este hallazgo es trascendental en la metástasis ósea del PCa.

Varios estudios han caracterizado a p27 como un factor pronóstico en diversos cánceres incluyendo el de próstata [Cordon-Cardo y col., 1998]. La disminución de la expresión de p27 en células tumorales puede conferirles la capacidad de crecer en un ambiente de matriz extracelular con propiedades de adhesión alteradas y esto puede facilitar la metástasis. Se ha observado que PCa primarios con bajos niveles de la proteína p27 fueron biológicamente más agresivos, mientras que los tumores con altos niveles de p27 son más sensibles a la ablación de andrógenos, el tratamiento primario de la enfermedad metastásica. Mas aún, se determinaron niveles disminuidos o indetectables de la proteína p27, a pesar de presentar niveles detectables de su ARNm, como consecuencia de transformaciones post-transcripcionales [Cordon-Cardo y col., 1998]. Un modelo de carcinogénesis prostática murino reveló que había un aumento en la progresión tumoral cuando los niveles del gen p27^{Kip1} se reducían a la mitad, sin embargo mayores disminuciones de la actividad de p27 inesperadamente inhibían la progresión [Abate-Shen y Shen, 2005; Zinkel y col., 2006]. Una comparación entre la inmunexpresión de p21 y p27 en glándulas benignas, PIN y PCa mostró que

altos niveles de p21 y bajos niveles de p27 estuvieron correlacionados con factores de pronóstico adverso del PCa. La declinación de los niveles de p27 con la edad avanzada, en áreas del tumor y PIN puede ser una posible explicación de la mayor frecuencia del adenocarcinoma prostático en hombres ancianos [Doganavsargil y col., 2006].

Por lo tanto se requieren posteriores estudios para determinar el rol de p21 y p27 en el desarrollo del cáncer.

Las kinasas activadoras de ciclinas y su relación con el cáncer de próstata

La amplificación y sobre expresión de CDKs han sido raramente descritas en cánceres. En PCa prácticamente no hay reportes sobre alteraciones en la expresión de estas proteínas que puedan asociarse a la evolución de la enfermedad. Por ejemplo, se ha descrito que el aumento de la proteína CDK4 no estaba involucrado con el desarrollo del carcinoma prostático [Halvorsen y col., 2000].

El proteasoma

El proteasoma es importante para mantener la homeostasis celular por su función en la degradación de proteínas mutantes, dañadas o no funcionales y recientemente se ha hallado que interviene en la eliminación de proteínas reguladoras del ciclo celular marcadas por ubiquitinación [Tansey, 2004]. La función de la vía ubiquitina-proteasoma es esencial para muchos procesos celulares, como la regulación de la señalización de receptores, la angiogénesis y la apoptosis [Landis-Piwowar y col., 2006].

La vía ubiquitina-proteasoma (UPP) comprende dos pasos. El primero es la ubiquitinación de la proteína en un residuo lisina. Luego otras moléculas de ubiquitina se agregan de forma secuencial para formar la cadena de poliubiquitina, lo que permite el reconocimiento de la proteína diana por el proteasoma. Dentro del proteasoma, la proteína marcada es desubiquitinizada y degradada en pequeños polipéptidos [Voorhees y col., 2003].

El proteasoma y el cáncer

En el cáncer el proteasoma puede contribuir a la estabilización de proteínas debido a la disminución en su degradación o a su pérdida debido a degradación acelerada. Numerosos estudios demostraron que las células transformadas son significativamente más sensibles a la inhibición del proteasoma que las células normales [Landis-Piwowar y col., 2006].

Muchas proteínas importantes son reguladas por el proteasoma, incluyendo NF- κ B, el supresor tumoral p53, y las proteínas p21, p27 y Bax, entre otras. Además, p21 y Bax podrían acumularse en respuesta a la inhibición del proteasoma aún en ausencia de p53 [Li y Dou, 2000]. Se ha observado que niveles disminuidos de la proteína pro apoptótica Bax están asociados con un aumento de la actividad del proteasoma en PCa con alto grado de Gleason [Li y Dou, 2000].

Por otro lado, se ha comprobado que inhibidores del proteasoma inducen la expresión de HO-1 vía la activación de p38 MAPK [Wu y col., 2004]. Además, la hemina, el inductor específico de la HO-1 es un inhibidor de la actividad proteosomal [Grunberg-Etkovitz y col., 2006].

Apoptosis

La apoptosis es un proceso que puede producirse a través de dos caminos, la vía mitocondrial o vía un proceso iniciado por señalización de receptores. El disparo de la apoptosis después del daño al ADN es dependiente del tipo celular. Se ha observado que algunos tipos celulares tienen un umbral bajo para la activación y otros raramente van hacia apoptosis [Jeggo y Lobrich, 2006]

Las características morfológicas de la apoptosis fueron extensamente descritas e incluyen: separación de las células adyacentes y condensación del citoplasma; disminución del volumen celular; condensación de la cromatina (piknosis); fragmentación nuclear; "burbujeo" de la membrana plasmática; redondeamiento celular; fragmentación del citoplasma en múltiples y pequeños cuerpos apoptóticos, constituidos por cromatina condensada, organelas citoplasmáticas, mitocondrias y lisosomas intactos, rodeados por membranas

íntegras; endocitosis y degradación de los cuerpos apoptóticos por células vecinas o por fagocitos.

La muerte celular por apoptosis transcurre con conservación de las membranas y los lisosomas, sin la liberación del contenido citoplasmático o de las enzimas lisosomales, a diferencia de la necrosis, evitando así la respuesta inflamatoria. En cuanto a las características bioquímicas, la primera etapa parece correlacionarse con el colapso de la cromatina contra la periferia nuclear. Las endonucleasas clivan progresivamente al ADN geonómico generando inicialmente fragmentos de 50 a 300 Kb y luego fragmentos de 180 pb o múltiplos, formándose así la típica escalera de ADN, que se visualiza por electroforesis en geles de agarosa. Sin embargo se ha descrito apoptosis de morfología típica en células con aparente falta de actividad de endonucleasa endógena, así como también en células con ausencia de la "escalera" oligonucleosomal, sugiriendo otras vías de muerte celular programada.

La apoptosis evoluciona en tres etapas secuenciales que duran entre 12 y 24 horas. En la etapa de inducción la célula recibe un estímulo inductor que desencadena una cascada de señalización que dirigirá a la célula a iniciar la apoptosis. Esta etapa es regulable, y la célula decidirá si sobrevive o continua con el proceso apoptótico. La etapa efectora, en la cual el destino celular se vuelve irreversible y por último la etapa de degradación final.

Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 juegan un rol clave en la regulación de la apoptosis dependiente de la mitocondria/apoptosoma. Las regulaciones bioquímicas y fisiológicas de esta familia de proteínas determina si una célula sobrevive o se muere por apoptosis [Maddika y col., 2007]. Estas proteínas regulan la permeabilidad mitocondrial. Este grupo está constituido por proteínas que promueven la apoptosis, como Bax y Bad, y otras que son anti apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL. Bcl-2 se localiza en la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear. Su efecto antiapoptótico es llevado a cabo por vía directa previniendo el aumento de la permeabilidad mitocondrial y la subsiguiente liberación del citocromo c [Kluck y col., 1997; Yang y

col., 1997], o por un efecto indirecto mediado por el secuestro de otras proteínas como el factor activador de proteasas pro apoptóticas (APAF-1).

La etapa de ejecución de la apoptosis es conducida por una cascada de proteasas conocidas como caspasas. Esta familia incluye más de 10 miembros, que se presentan como precursores inactivos, que se activan por el clivaje autocatalítico o por otras caspasas. Funcionalmente se consideran dos grupos:

Caspasas iniciadoras: como las caspasas 8 y 9

Caspasas ejecutoras como la caspasa 3. Estas caspasas causan disrupción del citoesqueleto y de la matriz nuclear debido al clivaje de sus proteínas. Otros sustratos nucleares de las caspasas incluyen endonucleasas y proteínas comprometidas en la transcripción, en la replicación y en la reparación del ADN. De este proceso surgen las características morfológicas y bioquímicas que caracterizan la apoptosis.

Ha sido de interés la observación de que la fosforilación de Bcl-2 regula los niveles intracelulares de ROS y subsecuentemente inhibe la progresión del ciclo celular al demorar la transición G1/S [Maddika y col., 2007].

La proteína Bax ha sido descrita por acelerar la progresión de la fase S, aunque los mecanismos moleculares de este evento aún no han sido dilucidados [Zinkel y col., 2006].

Se encuentra bien documentado que el clivaje mediado por caspasa-3 y la inactivación de la proteína p21 pueden inducir apoptosis en células arrestadas en el crecimiento [Zhang y col., 1999].

Por otro lado, la proteína p53 tiene actividad de supresor tumoral y promueve la expresión de genes involucrados en apoptosis. La apoptosis dependiente de la inducción de p53 procede a través de la liberación río abajo del citocromo c de la mitocondria. En respuesta a estímulos de estrés p53, el cual normalmente se expresa a bajos niveles, se acumula dentro de las células debido a un aumento en la estabilidad de la proteína. Además p53 integra señales de varios caminos que se activan como resultado de diferentes estímulos tales como daño al ADN, hipoxia y activación de oncogenes [Giono y Manfredi, 2006]. Bajo estas

condiciones, p53 inicia varias respuestas celulares que pueden conducir a arresto del ciclo celular, senescencia, diferenciación, reparación del ADN, apoptosis e inhibición de la angiogénesis. Bajos niveles de estrés o daño al ADN inducirían los niveles de p53, que a su vez activarían a genes para arrestar el crecimiento. En contraste, bajo severo estrés celular se expresan altos niveles de p53 y la estabilización de la proteína activa caminos apoptóticos. La proteína p53 previene la iniciación de la replicación del ADN en el punto de chequeo G1/S por inducir al inhibidor p21, el cual inhibe la fosforilación de Rb. Además, p21 induce arresto del crecimiento en las fases G1 y G2 [Giono y Manfredi, 2006].

En PCa, mientras las mutaciones en p53 no son comunes en la enfermedad temprana y bien diferenciada, las mutaciones se vuelven abundantes tanto en la enfermedad metastásica como en la enfermedad hormona independiente [Navone y col., 1999].

Apoptosis y cáncer de próstata

Es ampliamente aceptado que la tasa neta de crecimiento tumoral es la diferencia entre la tasa mitótica y la apoptótica. La evasión apoptótica representa una de las principales características del cáncer y aparece como un componente vital en la resistencia inmunogénica, quimioterapéutica y radioterapéutica que caracteriza a la mayoría de los cánceres humanos y también al PCa [Hanahan y Weinberg, 2000]. La pérdida del control apoptótico provee una de las bases moleculares para la contribución de los pasos defectuosos en el camino hacia el desarrollo y progresión del PCa [Zeng y Kyprianou, 2005]. La adquisición de señales de transducción anti apoptóticas conduce finalmente a la resistencia al tratamiento, característica que tipifica a los cánceres avanzados de próstata. [McKenzie y Kyprianou, 2006]. En células de PCa sensibles a andrógenos, estas hormonas regulan negativamente la expresión de los miembros pro apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax [McKenzie y Kyprianou, 2006]. El aumento de la expresión de Bcl-2 y Bcl-xL en tumores insensibles a andrógenos está directamente relacionado con la capacidad de las células de PCa a sobrevivir en

ambientes libres de andrógenos, evidencia que resalta el significado tanto funcional como predictivo de la sobre expresión de Bcl-2/Bcl-xL como uno de los reguladores claves que permiten la selección de recurrencia andrógeno independiente en terapias de ablación de andrógenos prolongadas [McKenzie y Kyprianou, 2006].

La inhibición de la apoptosis tanto como el aumento de la proliferación celular es un factor crítico patofisiológico que contribuye al desarrollo del adenocarcinoma prostático [Gurumurthy y col., 2001].

Los tumores con RA (-) expresan niveles más altos de Bcl-2 que aquellos PCa que tienen niveles bajo/medios de RA. Sin embargo, hay tumores que expresan altos niveles de RA y también tienen una alta expresión de Bcl-2 [Huang y col., 1996].

La expresión de caspasa-3 es un buen indicador de la actividad apoptótica en próstata. Se observó disminución de dicha expresión en PIN y PCa [Winter y col., 2001] y esta disminución parece indicar una mayor resistencia a la muerte celular programada como signo de premalignidad en el PIN y quizás con significado pronóstico en la progresión de la enfermedad tumoral prostática [Winter y col., 2001].

Hemo oxigenasa-1 y su relación con el ciclo celular

Hasta la fecha se han publicado resultados contradictorios sobre el rol de HO-1 en la regulación del ciclo celular.

Algunos trabajos demostraron que la sobre expresión de HO-1 induce al inhibidor de la kinasa dependiente de ciclina p21 en SMC [Duckers y col., 2001] y en células epiteliales de riñón [Inguaggiato y col., 2001]. En astroglia, en músculo liso vascular, en epitelio tubular proximal y en carcinoma de mama, la activación de HO-1 resultó en arresto del crecimiento celular y este efecto se asoció a la inducción de p21. Estos eventos provocaron una disminución de la proliferación y confirieron marcada resistencia a la apoptosis contribuyendo de esta manera a un patrón alterado del crecimiento y la muerte celular [Gonzalez-Michaca y col.,

2004; Was y col., 2006]. Este mismo efecto se observó en células humanas de tumores gástricos. Los autores sugirieron que p21 ejercía protección contra el daño oxidativo y promovía la supervivencia de las células. El tratamiento con hemina provocó un marcado incremento en los niveles de esta proteína, aumentando el porcentaje de células en la fase *G0/G1* a expensas de la disminución en *S/G2/M*. Esta distribución no fue afectada por el estado de p53 [Liu y col., 2004]. En células epiteliales inmortalizadas de túbulos renales de rata (IRPTCs) expuestas a hemina (10 μ M), también se indujo la expresión de p21 (dependiente de HO-1) y arresto del ciclo celular en *G0/G1* con inhibición del crecimiento sin cambios en la apoptosis [Gonzalez-Michaca y col., 2004]. El mismo patrón de distribución de las células en las distintas fases del ciclo y de expresión de HO-1 y de p21 se detectó en células papilares de carcinoma de tiroides (KAT5) por tratamiento con hemina 20 μ M. Paralelamente al arresto del ciclo, las células con HO-1 y p21 elevados presentaron mayor resistencia a la apoptosis [Chen y col., 2004]. Otro estudio mostró que la administración de CO exógeno inhibía la proliferación de VSMCs, involucrando un arresto en *G0/G1* dependiente de GMPc; este arresto requirió del inhibidor p21, de la activación de p38 MAPK y de la inhibición de ciertos factores de transcripción específicos del ciclo celular [Ryter y col., 2004]. Sin embargo, el significado patológico de estos eventos es incierto hasta el presente.

En fibroblastos de hámster se reportó que una alta expresión de HO-1 se correlacionaba con aumento de los niveles de p53, y que estos niveles provocaban notorias perturbaciones en el ciclo celular [Suttner y Dennery, 1999]. En SMC la sobre expresión de HO-1 se asoció con disminución en la progresión del ciclo celular; contrariamente a lo que ocurrió con células endoteliales, donde el aumento en la progresión del ciclo celular se vio reflejada por la distribución celular en las fases *S* y *G₂/M* [Li Volti G. y col., 2002].

Utilizando la técnica de micro arreglos de ADN mediante transferencia del gen *ho-1* en células humanas endoteliales de la micro vasculatura dérmica se observó que la sobre expresión de HO-1 estaba asociada con la supresión de los genes inhibidores del ciclo celular p21 y p27, sin afectar a los genes p53 y p16,

contribuyendo a la progresión del mismo [Abraham y col., 2003]. Esta evidencia sugiere que HO-1 podría actuar como primera línea defensiva contra el estrés y el daño al ADN en las fases tempranas del ciclo celular, a fin de asegurar la división normal. Otros genes que se encontraron sobre expresados fueron los involucrados en la proliferación celular como ciclinas A1, D3 y E, como así también del factor de crecimiento angiogénico vascular endotelial (VEGF) [Abraham y col., 2003]. La sobre expresión de HO-1 también se asoció con moléculas involucradas en la apoptosis como Bcl-xL [Kushida y col., 2002]. Sin embargo, se observó disminución de los niveles de los ARNm de Bak, caspasa 2 y caspasa 6, CDK4 y CDK6 [Abraham y col., 2003].

En resumen la regulación del ciclo celular y la apoptosis por inducción de la expresión de HO-1 es dependiente del tipo celular.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las especies reactivas de oxígeno producidas por estrés oxidativo conllevan al daño de las estructuras celulares, provocando remodelamiento y proliferación del tejido prostático. La expresión de la Hemo oxigenasa-1 (HO-1) en el proceso tumoral podría o contrarrestar el daño peroxidativo desencadenando la apoptosis de las células neoplásicas o podría protegerlas jugando un rol antiapoptótico, conduciendo a la proliferación descontrolada. La comprensión del circuito molecular que afecta a la célula tumoral y su entorno podría proveer nuevas estrategias terapéuticas.

OBJETIVO GENERAL

En esta tesis nos propusimos estudiar el rol de la proteína inducible por estrés oxidativo HO-1 en el comportamiento biológico del cáncer de próstata, dada la posible asociación entre su expresión y algunos de los eventos claves en la progresión tumoral y la falta de trabajos en este campo. Con el objetivo de identificar nuevos parámetros capaces de anticiparse a la evolución del carcinoma prostático, se analizará la utilidad de HO-1 como posible marcador biológico y/o pronóstico en muestras de pacientes.

Puesto que se han publicado pocos resultados consistentes sobre el rol de HO-1 en la regulación del ciclo celular en células tumorales, en una segunda etapa se investigará el mecanismo de la respuesta celular mediada por HO-1 frente al estrés oxidativo y se analizará la regulación del ciclo celular y el balance entre proliferación y muerte en células de cáncer de próstata.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estudios *ex vivo*

1. **Estudiar la expresión y localización de HO-1 en pacientes con cáncer de próstata. Utilidad como biomarcador.**

Mediante inmunohistoquímica se analizará la expresión y localización de la proteína marcadora de estrés oxidativo HO-1 en muestras de carcinomas primarios de próstata y de hiperplasia benigna. En las muestras de cáncer de próstata se estudiará la zona tumoral y el parénquima no neoplásico. Se correlacionarán los resultados con parámetros clínicos y patológicos. Se establecerá el posible uso de esta molécula como marcador biológico y/o pronóstico en el cáncer de próstata.

Estudios *in vitro*

2. **Estudiar la expresión y localización de HO-1 en células de cáncer de próstata en condiciones basales, sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor o a un inhibidor de dicha proteína.**

Se utilizarán en este estudio dos líneas celulares de cáncer de próstata que representan un modelo andrógeno dependiente (LNCaP) y uno andrógeno independiente (PC3). Se utilizarán los siguientes agentes: H₂O₂ como modelo clásico para generar estrés oxidativo, hemina como inductor específico de la actividad y expresión de HO-1 y SnPP como inhibidor específico de la actividad pero no de la expresión de HO-1. Se utilizará el ensayo de MTT para medir la viabilidad celular por exposición a los distintos tratamientos. Mediante las técnicas de western blot (con fraccionamiento celular) e inmunocitoquímica se evaluará la expresión y localización de la proteína.

3. **Estudiar la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y la apoptosis en células de cáncer de próstata sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor de HO-1**

Mediante la técnica de western blot se evaluará la expresión de algunas de las proteínas regulatorias del ciclo celular (ciclinas D1 y E, CDK4/2 y p27 y p21) y de la apoptosis (Bcl-2 y Bax). La muerte celular también será evaluada mediante el ensayo de actividad de caspasa-3. Se utilizará la técnica de citometría de flujo para estudiar la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo bajo los diferentes tratamientos.

- **Del análisis de los resultados obtenidos se intentará establecer la asociación entre la expresión de HO-1 y las moléculas regulatorias del ciclo celular y la apoptosis y su impacto sobre las células sensibles e insensibles a andrógenos.**

**MATERIALES
Y
METODOS**

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Reactivos y drogas

Peróxido de Hidrógeno (Merck, solución 30% w/w). Cloruro de Hemina equina (Sigma). Dicloruro de Estaño (IV) Protoporfirina IX (SnPP) (Frontier Scientific Europe, Ltd., Carnforth, Lancashire, United Kingdom). Bromuro de 3-[4,5 dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-terazolío (MTT). Cell Titer 96 aqueous one solution reagent (Promega). Ioduro de Propidio (Molecular Probe, Eugene, OR, USA). Digitonina (Calbiochem-Novabiochem corporation, La Jolla, CA). N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA) (Sigma, A2559). Kit para inmuno histoquímica LSAB+ DAKO Peroxidasa (HRP) (DAKO Corp.). Medio de montaje GVA (ZYMED, San Francisco, California, USA).

Anticuerpo HO-1: se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo específico para la región N-terminal, que consiste en un péptido sintético de 30 aminoácidos basado en la secuencia de la HO-1 humana (SPA-896) (Stressgen, Biotechnologies Corp.).

Especímenes de tejido prostático

Los pacientes fueron seleccionados por el Dr. Osvaldo Mazza (Jefe del Servicio de Urología del Hospital de Clínicas y del Hospital Alemán). Las muestras de tejido prostático fueron obtenidas del Departamento de Patología del Hospital Alemán, Buenos Aires, Argentina, y provienen de prostatectomías radicales de pacientes con carcinomas primarios de próstata. Un total de 85 pacientes con PCa fue seleccionado, representando la gama completa de la graduación de Gleason (4-10) y en un rango de edad entre 44 y 92 años. Ningún paciente recibió terapia ablativa hormonal preoperatoria. Se incluyeron en este estudio 39 BHP, las cuales mostraron hiperplasia de células estromales y/o epiteliales y no mostraron células malignas.

Equipos utilizados

Microscopio con cámara digital (Nikon). Espectrofotómetro. Lector de microplacas (Bio Rad). Cuba para electroforesis (Amersham GE y Bio Rad). Citómetro de flujo Coulter EPICS XL AB6064 (Beckman. Coulter, Fullerton, CA). Analizador de imágenes Bio-Imaging Analyser Fuji Film LAS-1000.

Métodos de los experimentos ex vivo

Análisis Inmunohistoquímico

Los tejidos fueron fijados en formaldehído al 4% y embebidos en parafina. Se cortaron secciones de 5µm. Se desparafinaron con xileno y se rehidrataron con etanol y buffer fosfato salino (PBS). La recuperación de antígenos se llevó a cabo en microondas (750W, 3x1 min) con buffer citrato de sodio 10 mM (pH 6). La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó incubando 10 min con H₂O₂. Luego se realizaron lavados con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con albúmina bovina sérica (BSA) 2% en PBS por 20 min. Para estudiar la expresión de HO-1 las muestras fueron incubadas con un anticuerpo HO-1 policlonal de conejo (Stressgen, Biotechnologies Corp) diluido 1:1000 en buffer de bloqueo por 8 hs a 4° C; posteriormente se incubaron con un segundo anticuerpo anti conejo IgG biotinilado (DAKO LSAB+Kit, HRP) por 30 min y por último con estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO LSAB+Kit, HRP) por 30 min. La reacción de peroxidasa con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) (DAKO LSAB+Kit, HRP) formó un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. La contratincción fue realizada con hematoxilina de Mayer's. Se utilizaron cortes seriados incubados sin el anticuerpo primario como controles negativos y para realizar las correspondientes tinciones con hematoxilina-eosina.

Las muestras fueron examinadas y analizadas por dos patólogos, Dr. R. Meiss (Jefe División Patología Experimental, Academia Nacional de Medicina) y Dr. G. Casas (Médico Patólogo, Hospital Alemán) en forma independiente sin ninguna información clínica o patológica previa. El error entre observadores fue calculado

en una examinación preliminar usando el mismo material. Esta examinación mostró que al menos 900 células tumorales debían ser evaluadas para obtener resultados que cayeran dentro del 5% de la media real estimada con una probabilidad del 95%. Al menos 20 campos al azar con un mínimo de 4.000 células fueron evaluados y las células fueron analizadas por el grado de expresión. Los casos se definieron como positivos para la expresión citoplasmática de HO-1 cuando 25% o más de las células fueron teñidas en cada sección y negativos cuando el porcentaje se encontraba entre 0-25% [Yanagawa y col., 2004]. En cuanto a la expresión de HO-1 en el núcleo, se consideró positiva cuando se detectó inmuno-reactividad de esta proteína, mientras que la tinción se consideró negativa cuando no se registraron núcleos positivos.

En las muestras de PCa se evaluaron tanto las zonas tumorales como las zonas adyacentes y que denominamos parénquima no tumoral.

Análisis estadístico

El análisis estadístico entre la expresión del antígeno y los parámetros clínico-patológicos fueron llevados a cabo usando el programa GraphPad InStat utilizando los test de Fisher o Chi-cuadrado.

Métodos de los experimentos in vitro

Líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de PCa: LNCaP y PC3 cuyas características se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de las líneas de PCa, LNCaP y PC3

Características	LNCaP	PC3
Origen	nódulo linfático	hueso
Sensibilidad a los andrógenos	+	-
Expresión de PSA	+	-
Utilidad	modelo andrógeno dependiente	modelo andrógeno independiente

La línea celular LNCaP [Horoszewicz y col., 1983] proviene de un adenocarcinoma de próstata humano respondedor a andrógenos y fue aislado de una biopsia de nódulo linfático supraclavicular, aspirado de un paciente con diagnóstico confirmado de metástasis de próstata. Expresa RA. Esta línea se utilizó como modelo del fenotipo andrógeno dependiente.

La línea PC-3 fue establecida de una metástasis de médula ósea y proviene de un adenocarcinoma de próstata humano. No expresa RA. Esta línea se utilizó como modelo del fenotipo andrógeno independiente.

Ambas líneas celulares fueron gentilmente provistas por la Dra. Nora Navone del MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA.

Cultivos celulares

Los cultivos de las células LNCaP y PC3 se realizaron con medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal bovino conteniendo penicilina 100 UI/ml y estreptomina 100 ug/ml y fueron mantenidos a 37° C en una atmósfera de CO₂ 5%. La densidad de siembra de las células LNCaP fue de 1x10⁵ células/cm² y de las PC3 1x10⁴ células/cm².

Tratamientos realizados

Los cultivos celulares de PC3 y LNCaP a 75-80% de confluencia fueron tratados, siguiendo el esquema de tratamientos de la **Fig. 11**, con:

- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 200 μM con el fin de provocarles daño oxidativo.

Luego de este tratamiento se lavaron con PBS. Posteriormente distintos grupos de células se incubaron por 22 hs con las siguientes drogas:

- Cloruro de Hemina (Hemina) 20 μM, un inductor específico de la actividad y de la expresión de HO-1.
- Dicloruro de Estaño (IV) Protoporfirina (IX) (SnPP) 10 μM, un inductor de la expresión de HO-1 e inhibidor específico de su actividad.

Medición de la concentración del H_2O_2 : Se realizó una dilución del stock (cuya concentración aproximada es 9 M) 1:1000 en agua bidestilada. Se prepararon 5 réplicas para medir. Se midió la absorbancia a 240 nm (UV) con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso. La concentración se calculó como

$$C = (\text{absorbancia a 240 nm/coef. ext molar}) \times 1.000$$

$$\text{Coeficiente de extinción molar} = 43.7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Preparación de la solución stock de hemina: [Muppala y col., 2000] 36 mg de cloruro de hemina se disolvieron en 0,4 ml de NaOH 0,5 N y se agregaron 0,5 ml de Tris-HCl 1M pH 8, se filtró utilizando filtros de 0,2 μm y se conservó alicuotado a -80°C . Inmediatamente antes de su uso se diluyó en PBS 1:100.

Preparación de la solución stock de SnPP: Se disolvieron 5 mg en 1,47 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). La solución se filtró utilizando filtros de 0,2 μm y se conservó alicuotada a -80°C . Se diluyó en medio de cultivo antes de su uso. La concentración utilizada de DMSO por pocillo no fue mayor al 0,2%.

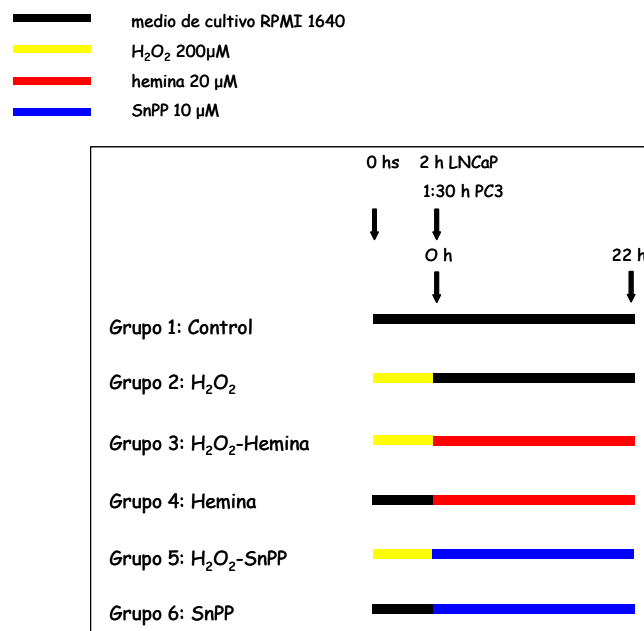


Figura 11. Esquema de los tratamientos realizados a las células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro*

Medición de la viabilidad celular

Las células LNCaP y PC3 fueron sembradas a una densidad de 3×10^4 células/200 μ l y 3×10^3 células/200 μ l respectivamente en placas de 96 pocillos. Las células fueron expuestas a distintas concentraciones de H_2O_2 (para hallar una concentración tal que la viabilidad fuera de aproximadamente el 50%). También se evaluó la viabilidad celular, en ambas líneas, luego de que estas fueran expuestas a los tratamientos descritos en la Fig. 11. En la línea celular PC3, la viabilidad fue determinada por el ensayo de reducción de MTT. El MTT es una sal de tetrazolium que se cliva a formazán por la enzima succinato dehidrogenasa de la cadena respiratoria mitocondrial, la cual está activa en las células vivas. Las células PC3 fueron tratadas con la solución de MTT (a una concentración final de 1,25 mg/ml) por 2 hs. Los cristales formados de formazán color azul oscuro en las células intactas fueron solubilizados con DMSO y la absorbancia fue medida con un filtro de lectura a 550 nm y un filtro de referencia a 620nm en un lector de microplacas. Para medir la viabilidad celular en la línea celular LNCaP se utilizó el kit comercial Cell Titer 96 aqueous, one solution reagent, siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia fue medida en un lector de microplacas con un filtro de lectura a 490 nm.

Análisis por western blot

Lisis celular: después de exponer las células LNCaP y PC3 a los tratamientos descritos en la Fig. 11 las mismas fueron colectadas, lavadas con PBS y centrifugadas a 1.000xg por 2 min a 4 °C. El pellet obtenido se trató con buffer de lisis (HEPES 50 mM pH 7, NP-40 1%, Aprotinina 1 μ g/ml, PMSF 100 μ g/ml, Leupeptina 1 μ g/ml, Pepstatina 1 μ g/ml, Na_3VO_4 1mM, NaF 20 mM) por 30 min a 4 °C, se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 min para remover los restos celulares y se separó el sobrenadante. Se utilizó una alícuota par medir concentración de proteínas por el método de Bradford y el resto fue almacenado a -80°C hasta su uso.

Medición de la concentración de proteínas: se utilizó el método de Bradford [Bradford, 1976]. La medición se llevó a cabo utilizando un micrométodo. Se realizó una dilución 1:10 de la proteína, se tomaron 10 μ l y se colocaron en un pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía 200 μ l de solución de Bradford. Se agitó y luego de 15 min se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 580 nm.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): las proteínas fueron separadas por su peso molecular en un gel de poliacrilamida 10-12 % (según el tamaño de la proteína estudiada) en condiciones desnaturalizantes [Laemmli, 1970] a 125 V por 1:30 hs con buffer SDS-Laemmli. Se sembraron en el gel cantidades equivalentes de proteínas (30 μ g). Antes de la siembra se adicionó buffer de carga conteniendo azul de bromofenol y β -mercaptoetanol y las muestras se calentaron por 3 min a 100 °C.

Transferencia a membranas de nitrocelulosa: una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham) a 250 mA por 1 h en buffer Towbin conteniendo metanol (20%). Se verificó que la transferencia fue exitosa tiñendo las membranas con rojo PonceauS. Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada 5%, Tween-20 0,1% en buffer salino Tris (TBS-T), pH= 7,4.

Detección de proteínas: para realizar la detección de las proteínas las membranas fueron incubadas con los diferentes anticuerpos. Las diluciones de los mismos se realizaron con buffer de bloqueo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: HO-1 policlonal de conejo (1:5000) (Stressgen, Biotechnologies Corp), p27/Kip1 monoclonal de ratón 2.5 μ g/ml (Oncongene, Research Products), Bcl-2 monoclonal de ratón (Dako Cytomation). También se usaron los siguientes anticuerpos policlonales de conejo: ciclina E (1:100), ciclina D1 (1:200) y Bax (1:300) (Santa Cruz Biotechnology, Inc); y los siguientes anticuerpos policlonales de cabra: CDK4 (1:300), p21 (1:300), CDK2 (1:500), Bcl-2 (1:200) y β -actina (1:700) (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Después de realizar los lavados con TBS-T, las membranas fueron incubadas con segundos anticuerpos anti conejo, anti ratón o anti cabra, según el anticuerpo primario utilizado, acoplados a peroxidasa (diluidos en TBS-T)

por 1 h a temperatura ambiente. Luego que las membranas fueran lavadas con TBS-T. Para visualizar las proteínas se utilizó el kit de detección ECL (Amersham GE), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. Todos los geles fueron corridos con un marcador de peso molecular Rainbow Marker (Amersham, GE). La visualización de las bandas se realizó con un analizador de imágenes o utilizando el método estándar con placas BioMax MS film (Kodak) o CP-BU New 100NIF (AGFA). Se utilizó β -actina como control de carga. Las bandas fueron cuantificadas densitométricamente utilizando el programa Scion Image.

Fraccionamiento subcelular. Preparación de extractos citoplasmático y nuclear para análisis por western blot

Las células LNCaP y PC3 cultivadas en placas de 100 mm fueron expuestas a los tratamientos descritos en la **Fig. 11, grupos 1-4**. Luego de aspirar el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS frío (2x5ml), se levantaron con 1ml de PBS, se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml (previamente enfriados) y se centrifugaron a 1.000xg por 2 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se agregaron 200 μ l de solución "A" de baja concentración de sales (HEPES 50 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, Aprotinina 1 μ g/ml, PMSF 100 μ g/ml, Leupeptina 1 μ g/ml, Pepstatina 1 μ g/ml, Na₃VO₄ 1mM, NaF 20 mM, pH 7,9), sin resuspender el pellet. Se centrifugaron a 1.000xg 2 min a 4°C y nuevamente se removió el sobrenadante. Luego se agregaron 200 μ l de solución "A", se vortexeó bien y se resuspendió el pellet con tip amarillo. Las células se incubaron en hielo 10-15 min para permitir que se hinchen. Se agregaron 12,5 μ l de una solución 10% de Nonidet NP-40 y se vortexearon vigorosamente por 10 seg. Posteriormente se centrifugaron a 12.000xg por 30 seg a 4°C. El sobrenadante (extracto citoplasmático) se colectó, se alícuotó y almacenó a -80°C inmediatamente hasta el momento del uso. Previamente se separó una alícuota para medir proteínas por Bradford. En este paso se verificó que la lisis celular se hubiese completado tomando una alícuota del pellet y tiñendo con azul tripan y observando al

microscopio. Se consideró que la lisis fue exitosa si el 80-90% de las células estaban azules. Al pellet nuclear se le agregó 50 μ l de solución "B", baja en concentración de sales + sacarosa (HEPES 50 mM, KCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, sacarosa 1 M, Aprotinina 1 μ g/ml, PMSF 100 μ g/ml, Leupeptina 1 μ g/ml, Pepstatina 1 μ g/ml, Na_3VO_4 1mM, NaF 20 mM, pH 7,9) y se resuspendió suavemente. Se centrifugó a 12.000xg 30 seg y se descartó el sobrenadante. Los núcleos fueron lisados agregando al pellet lentamente 50 μ l de solución "C", alta en concentración de sales (HEPES 50 mM, KCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, Aprotinina 1 μ g/ml, PMSF 100 μ g/ml, Leupeptina 1 μ g/ml, Pepstatina 1 μ g/ml, Na_3VO_4 1mM, NaF 20 mM, pH 7,9, glicerol 10%). Se homogeneizó con tip, se vortexeó vigorosamente por 20 min a 4 °C y se centrifugó a 12.000 rpm 10 min. Se colectó el sobrenadante (extracto nuclear) en tubos eppendorf enfriados. Se tomó una alícuota para medir proteínas y se conservó a -80°C hasta su uso. Se sembró igual cantidad de proteínas de ambos extractos (30 μ g) que fueron separadas en SDS-PAGE 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 250 mA por 1 h. Las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada 5%, Tween 20 0,1% en buffer salino Tris (TBS-T), pH= 7,4. Las diluciones de los anticuerpos primarios fueron hechas en TBS-T. Se utilizó anticuerpo HO-1 policlonal de conejo (1:5000) (Stressgen, Biotechnologies Corp). La presencia de proteínas citoplasmáticas fue verificada en todas las muestras utilizando el anticuerpo β -tubulin monoclonal de ratón (Sigma) y la presencia de proteínas nucleares fue verificada utilizando el anticuerpo laminina A/C monoclonal de ratón (1:10000) (Santa Cruz, Biotechnologies Inc).

Análisis Inmunocitoquímico

Se sembraron células LNCaP y PC3 en portaobjetos Lab Tek chamber Slide System y se expusieron a los tratamientos descritos en la **Fig. 11 grupos 1-4**. Luego se lavaron con PBS-T (2x 100 μ l/pocillo). Las células se fijaron con MetOH por 5 min a -10 °C. Posteriormente el MetOH se aspiró y se dejó secar el portaobjetos al aire. Las células se lavaron con PBS-T (3x 100 μ l/pocillo), y se

permeabilizaron con Triton X-100 0,2% en PBS por 10 min. Se incubaron con H₂O₂ (20 vol) 7% en PBS por 15 min (para bloquear las peroxidases endógenas). Luego de los lavados con PBS-T se bloquearon con BSA 2% en PBS-T por 20 min. La incubación con el anticuerpo primario HO-1 policlonal de conejo (1:1000) (Stressgen, Biotechnologies Corp) se realizó por 1 h a T ambiente. La exposición al segundo anticuerpo IgG biotinilado anti-conejo (DAKO LSAB+Kit, HRP) fue por 30 min y por último se realizó una incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO LSAB+Kit, HRP) por 30 min. La reacción de peroxidasa con 3,3'-diaminobenzidina (DAKO LSAB+Kit, HRP) como cromógeno se realizó bajo microscopio invertido, mostrando un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. Las células incubadas sin el anticuerpo primario fueron usadas como controles negativos. Se montó con medio de montaje hidrofílico.

Citometría de flujo para análisis del ciclo celular

Se utilizó Ioduro de Propidio (PI) como colorante para el análisis del ciclo celular [Krishan, 1975]. El PI se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del ADN y produce un aducto altamente fluorescente que puede ser excitado a 488 nm con un ancho de emisión centrado en alrededor de 600 nm. Dado que el PI puede también unirse al ARN, es necesario tratar a las células con RNAasa para una óptima resolución del ADN. Para la tinción de células enteras con PI, las mismas fueron tripsinizadas y lavadas con 1 ml de PBS frío. Se centrifugaron a 200xg por 5 min y luego se lavaron con PBS frío 2 veces. Una suspensión de 1-2x10⁶ células/ml se resuspendieron en 0.5 ml de PBS frío. Las células resuspendidas fueron transferidas gota a gota a un falcon de 15 ml conteniendo 4,5 ml de etanol 70% a -20 °C, donde fueron fijadas por 2 hs a 4 °C (las células se almacenaron -20 °C previo a la tinción y hasta el momento del análisis por citometría de flujo). Las células resuspendidas en etanol fueron centrifugadas 4 min a 3.000 rpm, lavadas 2x con PBS frío, resuspendidas en 0,5 ml de PBS y tratadas con 10 µl RNAasa A (Stock 10µg/µl, concentración final 200 µg/ml). Posteriormente se incubaron a 37°C durante 30 min en oscuridad. A continuación

se centrifugaron durante 4 min a 3.000 rpm, se resuspendieron en 0,5 ml de PBS y se congelaron hasta el momento del análisis. Se agregaron 100 µl de PI (Stock 0,1 mg/ml, para alcanzar una concentración final de PI de 20 µg/ml), 0,5 µl de Triton X-100 0,1% por al menos 30 min en oscuridad y se realizó el análisis en un citómetro de flujo. Se empleó un programa para histogramas de deconvolución de la frecuencia del contenido de ADN y se graficó el % de células en las distintas fases del ciclo celular.

Ensayo de actividad de Caspasa-3

Las células LNCaP y PC3 fueron crecidas en placas de 6 pocillos y expuestas a los tratamientos de la **Fig. 11 grupos 1-4**. Luego de lavar con PBS frío 2x para eliminar restos del medio de cultivo, se agregaron 180 µl/pocillo de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 10 mM, Digitonina 10 µM, PMSF 0,5 mM Bisbenzamidina 3,64 mM, Aprotinina 1 µg/µl), y se dejó con dicho buffer toda la noche a -20 °C. Se descongelaron los lisados celulares y se tomaron alícuotas para medir la concentración de proteínas por el método de Bradford. En una microplaca de 96 pocillos se realizó el ensayo de actividad de caspasa-3 colocando los reactivos en el siguiente orden: 146 µl de buffer de reacción (HEPES 100mM, Glicerol 10%, EDTA 1mM, DTT 10 mM, PMSF 0,5 mM, bisbenzamidina 3,64 mM, Aprotinina 1 µg/µl) más 4 µl del sustrato Ac-DEVD-pNA y 150 µl del lisado celular (conteniendo 100 µg de proteínas). Se incubó a 37 °C por 2 hs y 3 hs y se midió la p-nitroanilida liberada a 405 nm en un lector de placas a cada tiempo. Los datos obtenidos fueron comparados con los niveles de fluorescencia de la muestra control para determinar el nivel de activación de caspasa-3.

Análisis estadístico

Los experimentos *in vitro* fueron realizados por triplicado. La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar (SD), utilizando análisis de ANOVA y el test de Tukey para comparación

de las muestras. Los resultados obtenidos se consideraron de significancia biológica a un nivel de $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS PARTE 1. Estudios *ex vivo*

Estudio de la expresión y localización de Hemo oxigenasa-1 en pacientes con cáncer de próstata. Utilidad como biomarcador

Estudio de la expresión/localización de HO-1

La asociación frecuente de lesiones de PIA con la inflamación crónica sugiere que la inflamación crónica o recurrente en la próstata puede iniciar y promover el PCa. El rol del estrés oxidativo en PCa ha sido extensamente reconocido. El efecto final de estos eventos es producir remodelación y proliferación del tejido prostático. La terapia contra esta enfermedad se basa principalmente en la privación de andrógenos, ya que los tumores inicialmente crecen dependientes de hormonas. Desafortunadamente, esta terapia es paliativa ya que la mayoría de los tumores siguen progresando adaptándose al bloqueo de andrógenos tornándose refractarios a la terapia. Esta última etapa de la enfermedad es incurable. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas es inminente y para ello es necesario un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares del cáncer de próstata.

Dado que la capacidad de los marcadores clínicos es limitada, la búsqueda se ha enfocado en biomarcadores o marcadores moleculares. Hasta el presente no se han hallado marcadores que permitan predecir con seguridad el inicio de la enfermedad o categorizar la misma. Estos además de aportarnos conocimiento sobre la biología del tumor, tienen el potencial no solo de servir como factores pronósticos sino también ser blancos para nuevas estrategias terapéuticas y poder utilizarse para predecir la respuesta del tumor. La integración de marcadores seleccionados, a ensayos clínicos prospectivos, tiene el potencial de proveer terapias hechas a medida para blancos específicos en un mayor número de pacientes.

En el cáncer de próstata no se ha investigado si la expresión y localización de HO-1 tiene relación con el pronóstico y/o progresión de la enfermedad a nivel estadístico. Solo se cuenta con un reporte de Maines y Abrahamsson [1996] sobre

la expresión de HO-1 en 6 pacientes con PCA y con BHP. En este trabajo se sugirió que esta proteína jugaría un rol en la patogénesis de las enfermedades de la próstata. Dado que la expresión de HO-1 en cáncer aún es controvertida y depende del tipo celular, decidimos investigar la expresión/localización de HO-1 en PCa y sus posibles asociaciones con parámetros clínico-patológicos utilizados en el diagnóstico de esta enfermedad.

La evaluación de las muestras de los pacientes con PCa, que llevaron a cabo los patólogos R. Meiss (Jefe División Patología Experimental, Academia Nacional de Medicina), y G. Casas (Médico Patólogo, Hospital Alemán), se realizaron en forma independiente y sin ninguna información previa de la muestra.

Análisis inmunohistoquímico de HO-1 en cáncer de próstata y en hiperplasia benigna

Las características clínico patológicas de las muestras analizadas se muestran en la **Tabla 3**. Los pacientes se encontraban en un rango de edad entre 42-92 años.

En base a lo recomendado por la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y el Comité Estadounidense Conjunto sobre el Cáncer (AJCC) [Greene FL. y col., 2002; Sobin LH y Wittekind C, 2002], los tumores se clasificaron de acuerdo a la designación TNM.

La designación "T" se refiere a un tumor primario que no ha sido tratado previamente y se refiere a la clasificación del mismo.

T1: Tumores clínicamente no detectables por palpación o por imágenes.

T2: Tumor confinado dentro de la próstata

T3: Tumor que se extendió por la cápsula prostática

T4: el cáncer se ha extendido a los órganos vecinos, como la vejiga

Las muestras analizadas en este trabajo se encuentran dentro de las categorías T1-T3.

La designación "N" se refiere a la existencia de metástasis en nódulo linfático y la designación "M" hace referencia a la examinación microscópica de

lesiones distantes. Las muestras estudiadas en esta tesis son tipo NO MO, es decir sin metástasis y libres de tratamientos previos.

La clasificación pTNM, donde "p" se refiere a la examinación patológica, se lleva a cabo después de la resección quirúrgica del tumor primario. El estadio del mismo toma en cuenta la clasificación TNM y el grado del tumor (G). Este último se clasifica en:

G1: tumor bien diferenciado

G2: tumor moderadamente diferenciado

G3-4: tumor poco diferenciado o indiferenciado

Por lo tanto la estadificación de los tumores es la siguiente:

Estadio I: corresponde a los tumores T1 con G1 y NO MO.

Estadio II: corresponde a los tumores T1 con G2, G3-4 y a los tumores T2 con algún G y NO MO.

Estadio III: corresponde a los tumores T3 con algún G y NO MO.

Estadio IV: corresponde a los tumores T4 con algún G y NO MO; algún T/G y N1 MO; algún T/G/N M1.

Los tumores T1-2 son frecuentemente curables y se corresponden con los estadios I y II, mientras que los T3, tumores ocasionalmente curables, se corresponden con el estadio III. En este trabajo se estudiaron pacientes con estadio I, II y III.

La localización subcelular y la expresión de HO-1 se analizaron en secciones consecutivas de tejido provenientes de los 85 pacientes con PCa, cubriendo todos los rangos de progresión Gleason (4-10) (**Tabla 3**), mediante la técnica de inmunohistoquímica.

También se analizó la expresión y la localización de esta proteína en muestras provenientes de 39 casos de BHP, con el propósito de realizar la comparación entre el cáncer y la patología benigna de la próstata (dado que resulta prácticamente imposible disponer de material prostático normal, el cual debe ser obtenido por autopsia de hombres jóvenes adultos que aún no han desarrollado hiperplasia de la glándula).

Tabla 3. Características clínico-patológicas de los pacientes con PCA

Características	n (%)
Numero de casos	85
Edad (años; media \pm DS)	(44-92) 64 \pm 8,2
T factor	
T1	15 (17,6)
T2	40 (47,1)
T3	30 (35,3)
Grado de Gleason	
4	3 (3,4)
5	17 (20,0)
6	18 (21,2)
7	26 (29,2)
8	15 (16,9)
9 y 10	6 (6,7)
Estadío	
I	15 (17,5)
II	39 (58)
III	31 (36,5)

En los cortes de los tumores se evaluaron la zona tumoral y el parénquima no neoplásico. La examinación de los cortes de parafina mostró que el patrón de expresión de HO-1 se encontró restringido a:

- citoplasma
- citoplasma + núcleo

Por ende, se detectó tinción a nivel citoplasmático tanto en la zona tumoral, en el parénquima no neoplásico y en el tejido de las BHP. Las muestras analizadas no mostraron en ningún caso tinción nuclear exclusivamente. Estos hallazgos implican que, en los casos donde se detectó marcación nuclear, se debería a una translocación parcial de HO-1 desde el citoplasma hacia el núcleo.

En la **Fig. 12** se muestran algunas fotos representativas de los cortes analizados. En la **Fig. 12 a, b y c1** se muestran núcleos con variaciones en forma, tamaño e hipercrómicos, características de anaplasia. También puede observarse que hay invasión del estroma, sugerida por la rotura o ausencia de la membrana basal del acino prostático.

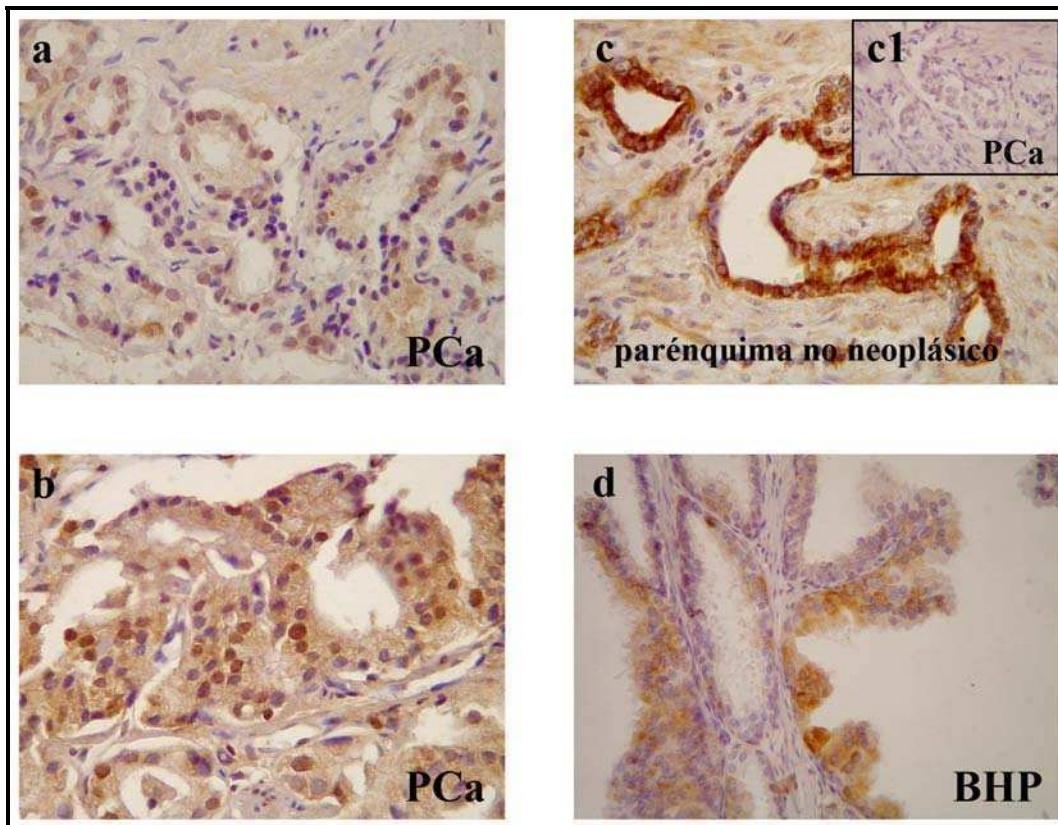


Figura 12. Inmunomarcación de HO-1 en tejido prostático humano en cortes de parafina.

Fotos representativas de la inmunoreactividad de HO-1. a) y b) Tinción nuclear y citoplasmática en muestras de PCa. c) Tinción citoplasmática en el parénquima no neoplásico circundante al tumor con exclusión nuclear de HO-1. c1) Tinción negativa nuclear y citoplasmática en la región tumoral de la muestra c). d) Estructura papilar de BHP cubierta por células con tinción de HO-1 negativa y positiva. Aumento 40X.

En la **Fig. 12 d** se observa la doble capa típica de las células prostáticas, compuesta de células epiteliales y basales. La **Fig. 12 a** representa un PCa moderadamente indiferenciado con tinción citoplasmática y nuclear en la zona tumoral. La **Fig. 12 b** representa un tumor más indiferenciado que el mostrado en la **Fig. 12 a** con mayor tinción citoplasmática y nuclear en la zona tumoral. En la **Fig. 12 c** se observa tinción citoplasmática con clara exclusión nuclear en la zona no neoplásica del tumor de la **Fig. 12 c1**, el cual es negativo para la expresión

citoplasmática y nuclear de HO-1. La Fig. 12 d muestra una hiperplasia benigna donde hay células positivas y negativas para HO-1.

No se observaron diferencias significativas ($p=0,53$) en la reactividad citoplasmática positiva entre el tumor (71/85, 84%), el parénquima no neoplásico (76/85, 89%) y las muestras de BHP (34/39, 87%) (Tabla 4). Tampoco hubo diferencias significativas ($p=1,00$) en la tinción de HO-1 positiva en el citoplasma de las células basales del parénquima no neoplásico que rodea al tumor (7/85, 8%) y de las células basales de BHP (3/39, 8%). Más aún, la relación entre la expresión de HO-1 en células epiteliales en el parénquima no neoplásico de PCa (89%) y BHP (87%) respecto a las basales (8% en ambos casos) fue similar reflejando una localización citoplasmática uniforme de HO-1 para los dos grupos estudiados (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis inmunohistoquímico de la expresión/localización de HO-1 positiva en pacientes con PCa y BHP.

		Tumor (n=85)		Parénquima no neoplásico (n= 85)		BHP (n=39)		p
		casos	(%)	casos	(%)	casos	(%)	
Citoplasma	Cél.epiteliales	71	(84)	76	(89)	34	(87)	0,53*
	Cél. basales	-		7	(8)	3	(8)	1,00**
Núcleo		55	(65)	30	(35)	9	(23)	< 0,0001*

*Test Chi-cuadrado. **Fisher's Exact Test

En cuanto a la tinción nuclear, clasificamos las muestras como positivas (aquellas que mostraron expresión positiva de HO-1 en el núcleo) y negativas (ausencia de expresión de HO-1). Fue de especial interés observar que la cantidad de casos con inmunotinción positiva nuclear para HO-1 en las muestras de PCa

(55/85, 65%) fue significativamente mayor respecto a la tinción positiva en el parénquima no neoplásico (30/85, 35%) y los casos con núcleo positivo de pacientes con BHP (9/39, 23%) ($p < 0,0001$) (Tabla 4).

Utilizando el Fisher's Exact Test se evaluó el riesgo relativo para la tinción nuclear (Tabla 5). Este test reveló que el factor de riesgo era de 3,45 para el tumor *vs* BHP (esto significa que es casi 3,5 veces más probable que el tumor tenga tinción nuclear positiva que BHP) y de 1,83 para el tumor *vs* el parénquima no neoplásico (esto significa que es 1,8 veces más probable que una muestra tenga núcleos positivos para HO-1 en la zona tumoral que en el parénquima no neoplásico) (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de las características histológicas y la expresión nuclear positiva de HO-1.

Histología	Riesgo relativo	95% CI*	p^{**}
Tumor/BHP	3,45	1,88 - 6,35	< 0,0001
Tumor/parénquima no neoplásico	1,83	1,32 - 2,55	0,0002
Parénquima no neoplásico/BHP	1,53	0,81 - 2,91	0,2138

* CI: intervalo de confianza (usando la aproximación de Katz). **Fisher's Exact Test

Análisis de la distribución de la cantidad de casos con tinción nuclear positiva de HO-1 en tejido prostático humano

Al analizar la distribución de la tinción nuclear, se observó que el porcentaje de células con tinción positiva para HO-1 era mayor en el citoplasma que en el núcleo en los tumores, parénquima no neoplásico y BHP (Fig. 13). El patrón de distribución nuclear es asintótico en todos los casos mientras que el de la tinción citoplasmática muestra una tendencia gaussiana sobre todo en la zona tumoral del PCa y en las muestras de BHP. Es interesante observar que en el parénquima no tumoral se observa una clara tendencia a aumentar la cantidad de casos con mayor

porcentaje de marcación citoplasmática positiva para HO-1 (70-90%), mientras que en el tumor la distribución del porcentaje de marcación citoplasmática positiva para HO-1 cubre un rango más amplio (50%-90%). Esto podría estar asociado con la translocación nuclear de la proteína en los tumores (**Fig.13**). En el caso de BHP, la distribución gaussiana y el rango de porcentaje de marcación citoplasmática positiva de HO-1 es semejante a la observada para la región tumoral de PCa. Este hallazgo podría estar asociado con las características inflamatorias del tejido hiperplásico.

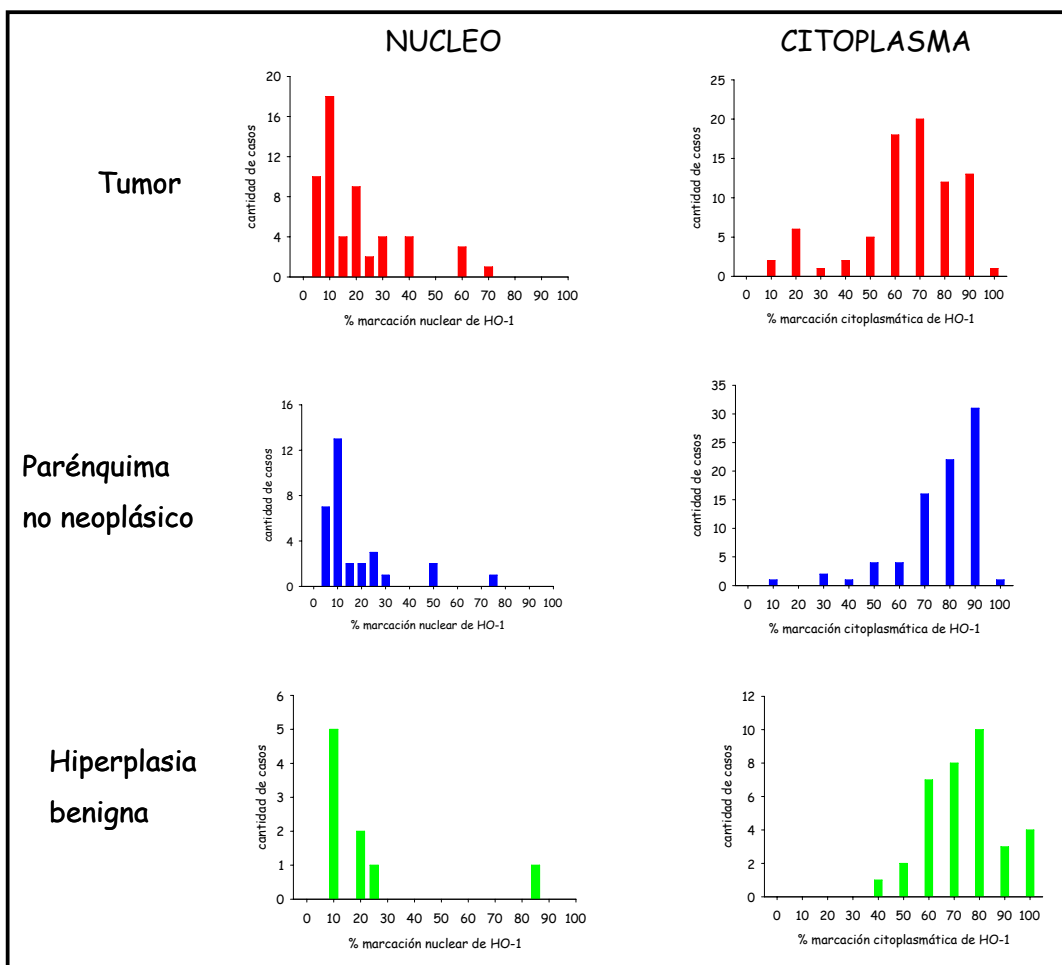


Figura 13. Histogramas del porcentaje de inmunomarcación citoplasmática y nuclear positiva para HO-1 en tejido prostático.

Asociación entre la expresión de HO-1 y los parámetros clínico-patológicos

Dado que el grado de Gleason es en la actualidad el parámetro patológico que se utiliza en la clasificación de los tumores de PCa, se decidió estudiar la relación entre el grado de Gleason y la expresión de HO-1.

La evaluación del grado de Gleason de las muestras de los pacientes con PCa, que llevaron a cabo los patólogos, se realizó siguiendo el criterio de la International Society of Urological Pathology, Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma [Epstein y col., 2005]. Se observó mayor cantidad de casos con tinción nuclear positiva para HO-1 en tumores más indiferenciados (grado de Gleason 8-10) (Tabla 6). Cuando se comparó con los grados de Gleason 4-6 la diferencia fue "casi significativa" de acuerdo al test de Fisher ($p=0,098$). El hecho de que no se haya logrado diferencia significativa completa estadísticamente, puede deberse al número de muestras relativamente bajo, debido a la dificultad de obtener tumores altamente indiferenciados (alto grado de Gleason) que no hayan recibido tratamiento previo al estudio informado en esta tesis. No ser "estadísticamente significativo" no significa que no sea "biológicamente importante". Consideramos entonces que este hallazgo debe ser tenido en cuenta pues está definiendo un nuevo subgrupo de pacientes en base a la expresión nuclear de HO-1 (Tabla 6).

Tabla 6. Relación entre la inmunoreactividad nuclear positiva para HO-1 y el grado de Gleason en muestras de PCa .

Grado de Gleason	Tumor n (%)	p^*	Parénquima no tumoral n (%)	p^*
4-5-6 (n=38)	20 (53)		13 (34)	
7 (n=26)	19 (73)	0,1230	10 (38)	0,79
8-9-10 (n=21)	16 (76)	0,098**	7 (33)	1,00

Fisher's Exact Test. * vs Gleason 4-5-6. ** El valor de p es considerado casi significativo

Uno de los factores de riesgo establecido para el PCa es la edad. Un estudio de curvas de incidencia específica de PCa con la edad revela que el riesgo de contraer la enfermedad comienza aproximadamente a los 55 años y presenta un pico a los 70-74 años [Sampson y col., 2007]. Por ende, se analizó la relación entre la expresión nuclear de HO-1 y la edad (**Tabla 7**).

Tabla 7. Correlación entre la expresión nuclear positiva de HO-1 de la zona tumoral con los parámetros clínico-patológicos de pacientes con PCa

Características	HO-1 núcleo positiva en el tumor (n=55) n° de casos (%)	p
Edad (años)		
≤ 60	16/23 (70)	
> 60	39/62 (63)	0,62 **
Factor T		
T1	10/15 (67)	
T2	26/40 (65)	
T3	19/30 (63)	0,97***
Estadío patológico		
I/II	37/54 (68.5)	
III	18/31 (58)	0,36**

** Fisher's Exact Test. *** Test de Chi-cuadrado

Utilizando el sistema de estadío TNM para carcinomas de la próstata, se analizó la relación del factor T y el estadío patológico con la expresión nuclear positiva de HO-1. No se observó asociación entre estos parámetros y la marcación nuclear positiva de HO-1, según se desprende del análisis univariado (**Tabla 7**).

Con respecto al parámetro de recurrencia bioquímica post operatorio, lamentablemente solo pudimos obtener datos de los niveles de PSA después de 6 meses de la prostatectomía de 47 pacientes (registrados en las respectivas historias clínicas). Se considera que el paciente se encuentra libre de la enfermedad para niveles de PSA < 0,1 ng/ml. En nuestro estudio un 53% (25/47) de los pacientes tuvieron recurrencia de la enfermedad (PSA > 0,1 ng/ml), y de éstos un

68% (17/25) además presentaron marcación nuclear positiva para HO-1. En cuanto a la reactividad nuclear positiva en los pacientes con PSA<0,1 ng/ml, el porcentaje fue también del 68% (15/22), lo cual nos indica que no hay asociación entre el PSA y la marcación nuclear positiva para HO-1 ($p= 1,00$ Fisher's Exact Test).

En resumen, dado que hay mayor número de casos con expresión nuclear positiva de HO-1 dentro de la zona tumoral, respecto a la zona no neoplásica y al tejido benigno, y a que hay una tendencia positiva con el grado de Gleason, estos resultados sugieren que la expresión nuclear estaría asociada con la transformación maligna.

RESULTADOS PARTE 2 y 3. Estudios *in vitro*

PARTE 2. Estudio de la expresión y localización de Hemo oxigenasa-1 en células de cáncer de próstata en condiciones basales, sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor o a un inhibidor de dicha proteína

Estudio del efecto HO-1 en la modulación del daño oxidativo mediado por H₂O₂ en células de cáncer de próstata

Para verificar este efecto se consideró necesario evaluar en las células LNCaP y PC3 los niveles endógenos de expresión de HO-1 en condiciones basales. Posteriormente se generó toxicidad celular, fijando un tiempo y concentración de incubación con un productor de ROS para obtener un 50% de células viables. En estas condiciones se analizó la expresión de HO-1 y la viabilidad celular, en presencia del activador farmacológico hemina y del inhibidor farmacológico SnPP.

Estudio de la expresión de HO-1 en células LNCaP y PC3

Por análisis de western blot (Fig. 14) se comprobó que hay expresión constitutiva de HO-1 en las líneas celulares LNCaP y PC3. Las células LNCaP (sensible a andrógenos) mostraron un nivel de expresión mayor que las células PC3 (insensible a andrógenos), indicando que ambas líneas celulares tienen niveles basales diferentes de estrés.

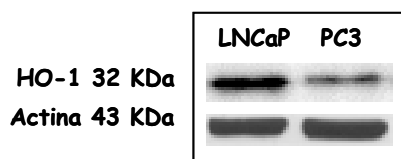


Figura 14. Western blot representativo que muestra la expresión de HO-1 en células de cáncer de próstata LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro*.

Las células fueron crecidas bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, hasta un 80% de confluencia, luego fueron cosechadas y sometidas a análisis por western blot. Se sembraron 30 µg de proteínas en cada calle. Se utilizó actina como control de carga.

Estos resultados están de acuerdo con anteriores donde se señaló que células epiteliales BSC-1 adaptadas a largo tiempo de exposición a estrés oxidativo presentaron actividad basal mayor de HO-1 que las cepas salvajes [da Silva y col., 1996].

Citotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno en células LNCaP y PC3

El mecanismo de adaptación a la exposición al H_2O_2 y el subsiguiente desarrollo de resistencia a estrés oxidativo aún no han sido totalmente dilucidados.

Se decidió utilizar como agente estresor H_2O_2 , por tratarse de un oxidante más débil comparado con otros productores de ROS, que está ubicuamente presente en todos los sistemas biológicos y que es soluble en lípidos y en medio acuoso [Droge, 2002], lo que le permite difundir fácilmente hacia sus blancos celulares [Halliwell y Gutteridge, 1989]. El H_2O_2 , causa daño celular al oxidar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos de membrana [Griendling y col., 2000]. Esta exposición a tal estrés oxidativo, puede inducir genes dentro de la célula, como el gen anti estrés HO-1. El H_2O_2 puede producir lisis celular dependiendo de la dosis. Además, la capacidad de este agente para inducir muerte varía con la densidad del cultivo y la presencia de suero en el medio de cultivo, y es dependiente de la concentración de H_2O_2 expresada en pmol/célula o de la concentración absoluta en μM .

Para determinar las condiciones de cultivo a fin de obtener una viabilidad del 50%, las células LNCaP y PC3 se crecieron a 80% de confluencia y se expusieron a distintas concentraciones de H_2O_2 (0-500 μM) durante diferentes intervalos de tiempo (1, 1:30, 2, 2:30, 3 h; datos no mostrados). La viabilidad celular se midió por el método de MTT. Este ensayo mostró que dependiendo de la concentración de H_2O_2 y del tiempo de exposición, la población de células viables disminuye. Se obtuvo un 50% de células viables cuando las células LNCaP se incubaron en presencia de H_2O_2 200 μM por 2:00 h, mientras que para las células

PC3, este mismo porcentaje se obtuvo a la misma concentración de H_2O_2 pero luego de 1:30 h de exposición (**Fig. 15**).

Observamos que las células LNCaP son más resistentes al daño oxidativo que las PC3. Este hecho podría estar asociado con la forma diferencial que tendrían estas células de responder al estrés oxidativo, lo cual a su vez, podría estar relacionado con el nivel de expresión basal diferente de la proteína HO-1 en ambas líneas celulares. La relación entre la función de citoprotección ejercida por HO-1 con su cinética de expresión es controvertida. No es claro aún, si el nivel basal de HO-1 antes del daño o el grado de sobre expresión de HO-1 seguido del daño es importante para conferir citoprotección [Amersi y col., 1999; Shi y col., 2000; Toth y col., 2003; Geuken y col., 2005].

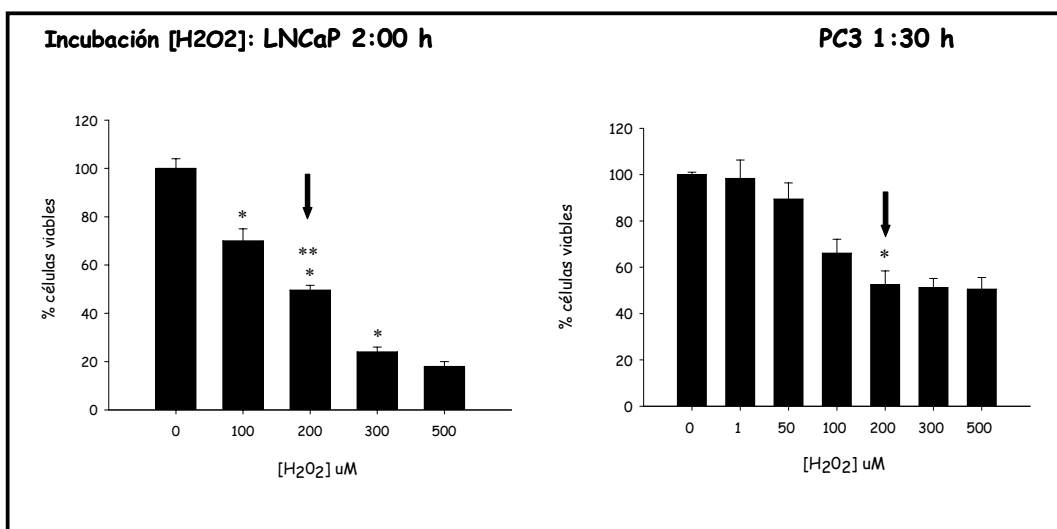


Figura 15. Efecto de la concentración de H_2O_2 sobre la viabilidad en las células LNCaP y PC3

El efecto sobre la viabilidad se ensayó sobre células que se incubaron en medio completo y se expusieron a H_2O_2 (0-500 μ M). La condición de 50% de viabilidad celular fue a H_2O_2 (200 μ M) para ambas líneas celulares. El tiempo de incubación para las células LNCaP fue de 2:00 h y para las células PC3 de 1:30 h. La viabilidad fue obtenida mediante el ensayo de MTT. Las barras representan el % de células viables respecto a la población celular control, calculándose la media \pm DS de sextuplicados. Resultados similares fueron obtenidos en otros 2 experimentos. * $p < 0,01$ vs control, ** $p < 0,05$ vs 100 y 300 μ M de H_2O_2

En los estudios que se detallan a continuación se utilizarán las siguientes condiciones de exposición a H_2O_2 200 μM :

- células LNCaP: 2:00 h
- células PC3: 1:30 h

Efecto de la hemina sobre la expresión de HO-1 en las células expuestas a daño oxidativo mediado por H_2O_2

Dado el rol emergente de HO-1 como una proteína inducible por estrés con el potencial de brindar protección celular contra diversos tipos de daño, nos planteamos si era factible inducir la expresión de HO-1 en células adaptadas a un determinado nivel de estrés oxidativo crónico, y si esta inducción era capaz de producir células resistentes a un nuevo desafío oxidativo.

La exposición de las células LNCaP y PC3 a H_2O_2 seguida de 22h de incubación con medio de cultivo fresco, resultó en una clara inducción de la expresión de HO-1 debido al estrés oxidativo generado por el agente oxidante. Cabe señalar que el daño produjo una mayor inducción de HO-1 en las células PC3 que en las LNCaP, respecto de las células crecidas en condiciones controles (**Fig. 16**). La expresión de la proteína HO-1 aumentó en respuesta al tratamiento con hemina en ambas líneas celulares, y este aumento de expresión fue más importante en las células PC3 que en las células LNCaP. Cuando las células expuestas a H_2O_2 fueron posteriormente tratadas con hemina (20 μM) se observó una inducción aún mayor de la expresión de HO-1 en ambas líneas celulares respecto a la respuesta que desencadenó el estresor solo (**Fig. 16**).

En este trabajo se utilizaron bajas concentraciones de hemina (20 μM), ya que a esta concentración ambas líneas celulares mostraron un significativo nivel de inducción de HO-1.

Se ha observado que las concentraciones de hemina hasta 100 μM no son citotóxicas en células endoteliales dependiente de anclaje ECV304 [Maruhashi y col., 2004]. La sobre expresión del gen *ho* humano aumentó considerablemente la resistencia de células endoteliales al daño oxidativo producido por hemo libre o

hemoglobina. El efecto protector fue sustancial y estuvo relacionado con la dosis, observándose protección hasta 200 μM de hemo/hemoglobina [Abraham y col., 1995]. En células RAW264.7 de macrófagos, la hemina (50-100 μM) tuvo un efecto protector sobre el daño inducido por H_2O_2 (200 μM), ya que se observó un aumento de la viabilidad celular en las células sometidas a daño oxidativo [Oh y col., 2006].

Reportes recientes mostraron que la sobre expresión de HO-1 por su sustrato hemina protege a las células de adenocarcinoma de colon C-26 y keratinocitos humanos de la injuria oxidativa [Nowis y col., 2006; Jazwa y col., 2006].

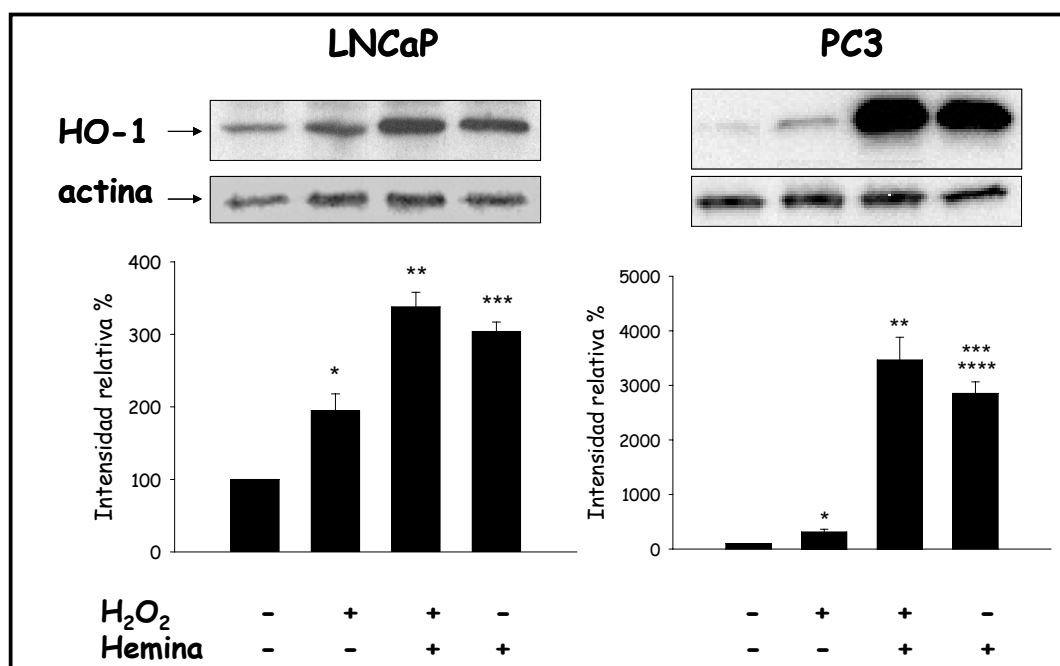


Figura 16. Expresión de HO-1 en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína HO-1. Las células se incubaron con H_2O_2 (200 μM) y luego 22 h con medio de cultivo fresco o en presencia de hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) durante 22 h. Las barras representan el análisis densitométrico de los niveles de HO-1 normalizados contra actina. Se calculó la media \pm DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. * $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs control, ** $p < 0,001$ vs H_2O_2 , **** $p < 0,001$ vs H_2O_2 -hemina.

Da Silva y col [1996] mostraron que la incubación de las células BSC-1 con hemina (20 μM) aumentó la actividad de HO en las células controles, y que en las células adaptadas a H_2O_2 , la actividad fue mucho mayor. Se comprobó, usando micro arreglos, que después de una exposición a H_2O_2 200 μM , la acumulación del ARNm de HO-1 alcanzó un máximo. Kemp y col. [Kemp y col., 2003] encontraron en miocitos ventriculares cardíacos de ratas recién nacidas, que la proteína HO-1 estaba sobre expresada sustancialmente tanto después de 2 h como de 4 h del tratamiento con H_2O_2 200 μM .

Efecto del SnPP sobre la expresión de HO-1 en las células expuestas a daño oxidativo mediado por H_2O_2

El SnPP es un conocido inhibidor competitivo de la actividad de HO y un activador transcripcional del gen *ho-1* [Sardana y Kappas, 1987; Chernick y col., 1989], que induce la expresión de la proteína HO-1 por mecanismos aún desconocidos.

Los estudios sobre la regulación transcripcional de HO-1 por análogos del hemo, demostraron que varias metaloporfirinas suprimen la actividad de HO *in vitro* e *in vivo* pero también inducen su transcripción vía efectos directos sobre el promotor de HO-1 [Abate y col., 2007].

Recientemente se ha reportado que la inhibición intra tumoral de la actividad de HO-1 por SnPP puede ser una potencial estrategia terapéutica, dado que el tratamiento con este inhibidor resultó en una clara reducción tanto de la transformación celular por virus oncogénicos, como del crecimiento tumoral [Marinissen y col., 2006].

En este trabajo el inhibidor farmacológico SnPP se usó en una concentración 10 μM . Se utilizó el modelo de inducir daño oxidativo con H_2O_2 y se analizó el efecto del inhibidor sobre dicho daño. Cuando las células expuestas a H_2O_2 se trataron con SnPP, la expresión de HO-1 en células LNCaP y PC3 aumentó respecto a las tratadas con H_2O_2 . La expresión de la proteína HO-1 aumentó en respuesta al

tratamiento con SnPP en ambas líneas celulares y el efecto fue mayor en las células PC3 que en las LNCaP (Fig. 17).

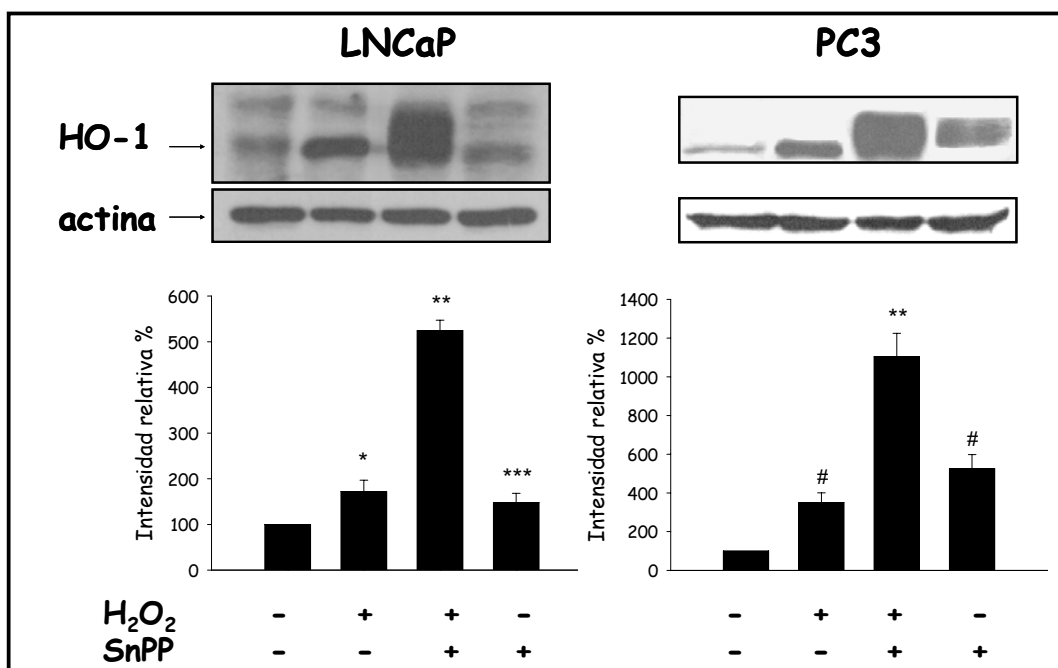


Figura 17. Expresión de HO-1 en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a SnPP

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína HO-1. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego 22 h con medio de cultivo fresco o con SnPP (10 μM); otro grupo de células fue expuesto a SnPP (10 μM) durante 22 h. Las barras representan el análisis densitométrico de los niveles de HO-1 normalizados contra actina. Se calculó la media±DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. **p*<0,01, ****p*<0,05, #*p*<0,001 vs control, ***p*<0,001 vs H₂O₂ y H₂O₂-SnPP.

Efecto de HO-1 en la modulación del daño oxidativo mediado por H₂O₂

El siguiente objetivo, fue estudiar si la expresión de HO-1 juega un rol relevante sobre la viabilidad celular luego del daño inducido por H₂O₂.

En las células LNCaP crecidas en condiciones controles, el tratamiento con hemina o SnPP no produjo ninguna alteración sobre la viabilidad celular. Tampoco estas drogas provocaron alteraciones sobre la disminución de la viabilidad celular

provocada por H_2O_2 (Fig. 18). Esto indica que en esta línea celular ni los niveles de expresión de la proteína en si misma, ni los productos de la actividad, fueron capaces de revertir el daño y reestablecer la viabilidad a los niveles controles.

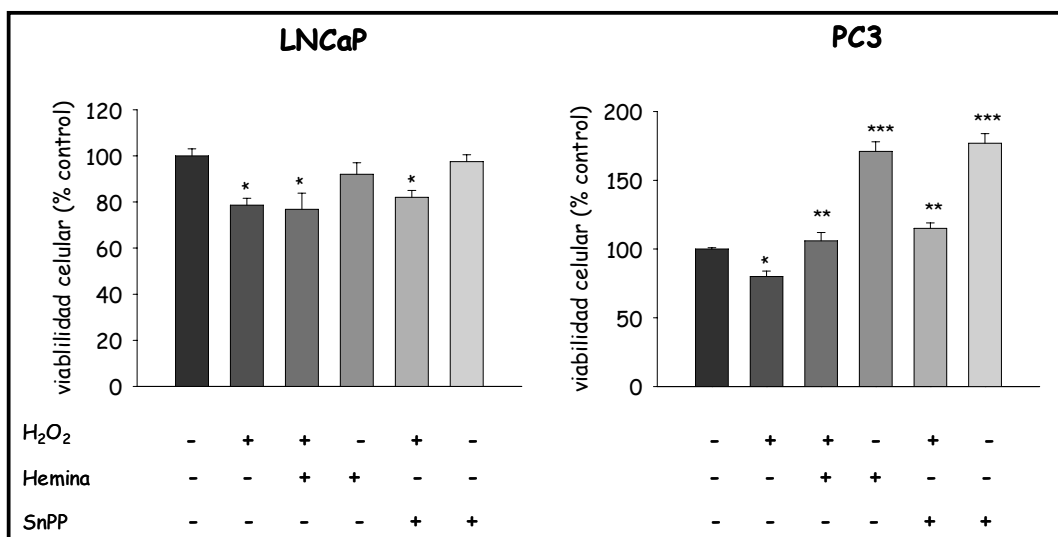


Figura 18. Análisis de la viabilidad celular luego del tratamiento con H_2O_2 , hemina y SnPP en células LNCaP y PC3 mediante el ensayo de MTT.

Las barras representan el porcentaje de células viables respecto a la población celular control, calculándose la media \pm DS de sextuplicados. Resultados similares fueron obtenidos en otros 2 experimentos. * $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs control. ** $p < 0,001$ vs H_2O_2

En cambio las células PC3, tratadas tanto con hemina como con SnPP aumentaron en forma significativa ($p < 0,001$) la viabilidad celular respecto del control. Además, en esta línea celular, la incubación con hemina, posterior al daño oxidativo provocado con H_2O_2 , fue capaz de aumentar significativamente la viabilidad celular (** $p < 0,001$ vs H_2O_2) revirtiendo el daño, dado que las células crecieron hasta alcanzar niveles de viabilidad celular comparables a los cultivos controles. El mismo efecto de aumento de la viabilidad fue observado cuando las células fueron posteriormente tratadas con el inhibidor de la actividad SnPP, indicando que la inducción de la expresión de HO-1 protege a las células PC3 del daño oxidativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la citoprotección ejercida por HO-1 se debe a la inducción de su expresión y por ende los parámetros evaluados a continuación se realizaron tratando a las células con hemina, la cual ejerce un importante efecto inductor en ambas líneas celulares.

Análisis inmunocitológico de la expresión de HO-1 en las líneas celulares LNCaP y PC3

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sobre la localización nuclear de HO-1 en las muestras de los pacientes y en el intento de caracterizar la respuesta de inducción de HO-1 al oxidante y a la hemina en células de cáncer de próstata, estudiamos la localización y expresión de la proteína HO-1 por inmunocitoquímica (Fig. 19).

Inmunomarcación positiva para HO-1 fue observada únicamente en el compartimiento citoplasmático de las células LNCaP (Fig. 19 a) y PC3 (Fig. 19 f) con exclusión nuclear. Cuando las células se expusieron al tratamiento con H₂O₂ pudo observarse que la marcación para HO-1 era más intensa que en el control y tiende a ser perinuclear tanto en LNCaP (Fig. 19 b) como en PC3 (Fig. 19 g). En las células PC3 pudo observarse que el perfil de inmuno-reactividad de HO-1 no fue homogéneo, ya que algunas células mostraron una marcación citoplasmática más intensa que otras (Fig. 19 h), mientras que en las LNCaP la inmunomarcación fue más homogénea en todo el preparado (Fig. 19 b).

El tratamiento con hemina condujo a una tinción citoplasmática muchísimo más intensa en ambas líneas celulares, comparada con las respectivas células controles. Un hallazgo interesante fue que la inducción por hemina condujo a una clara localización nuclear de HO-1 en LNCaP y PC3 (Fig. 19 d, e, j, k y l). Incluso se observó en la línea PC3 (Fig. 19 j, k y l) diferentes patrones de marcación nuclear, con tinción más intensa en células redondeadas (flechas en la Fig. 19 k y l) respecto a las que tienen profusiones (Fig. 19 j).

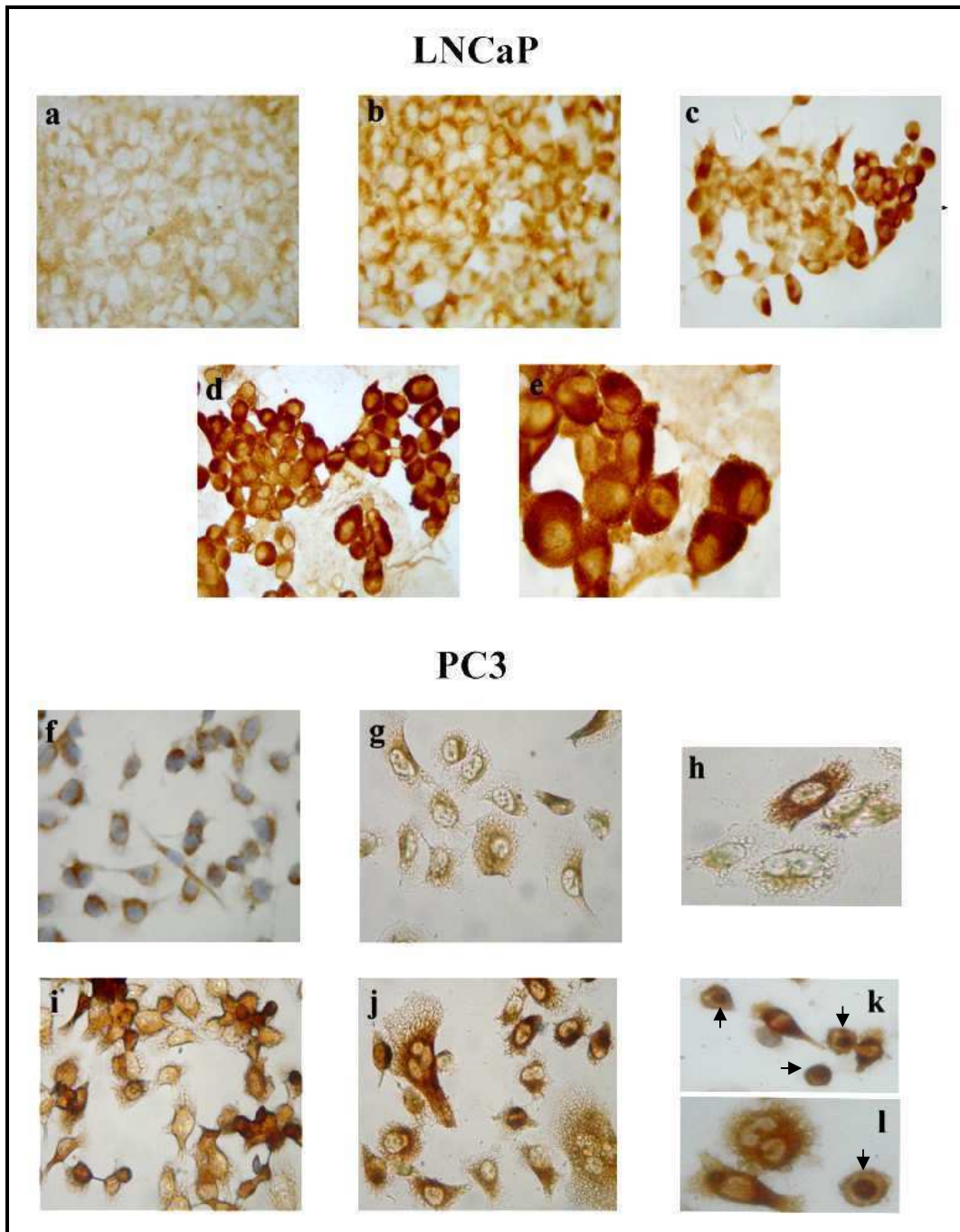


Figura 19. Detección inmunocitoquímica de HO-1 en células LNCaP y PC3

Se observó inmunotinción citoplasmática en las líneas LNCaP y PC3 cuando las células fueron crecidas en condiciones control (a, f) o expuestas a H₂O₂ (200 μM) (b, g, h). Hubo translocación nuclear de la proteína por el tratamiento con hemina 20 μM (22h) en ambas líneas celulares, tanto en las expuestas previamente a H₂O₂ (c, i) como en las células sin daño oxidativo (d, e, j, k y l). Las flechas de las fotos (k y l) señalan células con reactividad nuclear positiva para HO-1. Magnificación x 40 (a, b, c, d, f, g, h, i y j) y x 100 (e).

Por otro lado, la línea LNCaP tratada con hemina mostraba también en este caso un perfil de inmuno-reactividad nuclear más homogéneo (Fig. 19 d y e).

El tratamiento con H_2O_2 y posteriormente con hemina produjo un patrón heterogéneo en cuanto a la expresión de HO-1 tanto en las células LNCaP (Fig. 19 c) como en las PC3 (Fig. 19 i), observándose células con marcación citoplasmática similar a las células tratadas con H_2O_2 únicamente y otras que mostraron una marcación citoplasmática y nuclear más pronunciada (Fig. 19 c, i).

Efecto de la hemina en la localización celular de HO-1 en células LNCaP y PC3

Dado que por inmunocitoquímica observamos que las células de cáncer de próstata presentaban localización nuclear de HO-1 en respuesta a estímulos, y teniendo en cuenta el antecedente de que las muestras de pacientes con PCa mostraron localización nuclear de HO-1, decidimos corroborar su translocación nuclear por western blot y para ello realizamos fraccionamiento subcelular en las células LNCaP y PC3 (Fig. 20).

Siguiendo el mismo modelo que en los experimentos anteriores, ambas líneas celulares se expusieron a H_2O_2 200 μ M y luego 22 h con medio de cultivo fresco o se expusieron a hemina 20 μ M; otro grupo de células fue expuesto solamente a hemina durante 22 h. Se realizaron extractos proteicos de las fracciones citoplasmáticas y nucleares y se analizó la expresión de HO-1 por western blot.

Ambas líneas celulares mostraron sobre expresión de HO-1 en la fracción citoplasmática. El tratamiento con H_2O_2 indujo la expresión de HO-1 en el citoplasma de ambas líneas celulares. La exposición a hemina produjo una importante inducción en el citoplasma tanto de las células controles como las tratadas previamente con H_2O_2 .

Los extractos nucleares mostraron expresión de HO-1 cuando las células fueron expuestas a hemina o al tratamiento con H_2O_2 y hemina. Los niveles de expresión en el núcleo fueron menores que en el compartimiento citoplasmático.

Esto nos indica que hay una translocación parcial de la proteína HO-1 hacia este compartimiento (Fig. 20).

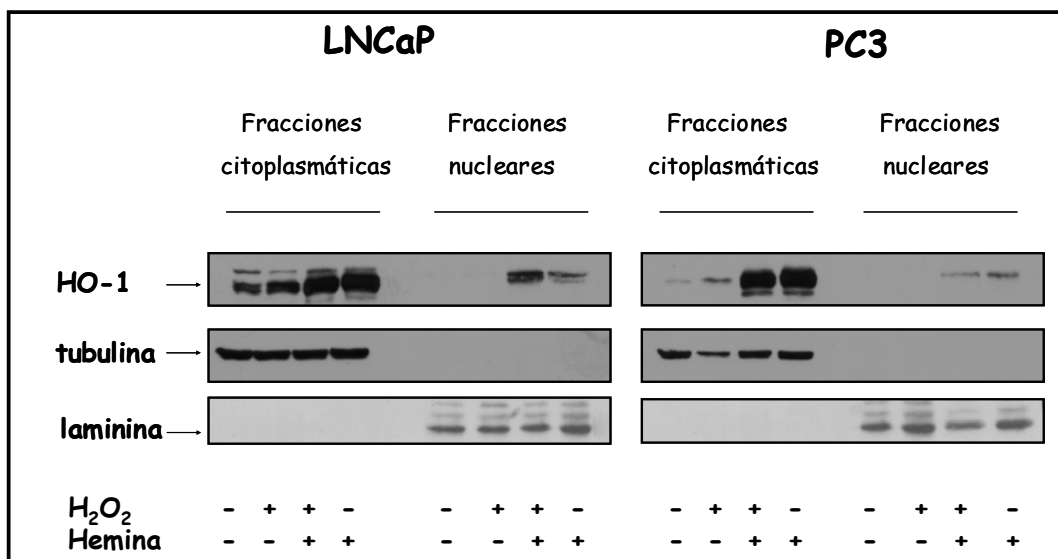


Figura 20. Expresión y localización de HO-1 en las fracciones citoplasmáticas y nucleares en células LNCaP y PC3

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína HO-1. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) durante 22 h. Se sembró 30 μg de proteínas de cada fracción. Se utilizó anticuerpo monoclonal β-tubulina para demostrar que los extractos nucleares no estuviesen contaminados con proteínas de la fracción citoplasmática, y se utilizó el anticuerpo monoclonal laminina A/C para verificar que la fracción citoplasmática no tuviese contaminantes nucleares. Ambos anticuerpos además se utilizaron como control de carga.

PARTE 3. Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y la apoptosis en células de cáncer de próstata sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor de HO-1

Control del ciclo celular

Las aberraciones genéticas en el control de la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular están virtualmente presentes en todos los tipos de cánceres humanos. La inhibición de la progresión desregulada del ciclo celular en células tumorales es una estrategia efectiva para intentar interrumpir el crecimiento del tumor.

En la última década se han descrito avances significativos en el conocimiento de las bases moleculares que controlan el ciclo celular, debido al descubrimiento y análisis funcional de las ciclinas regulatorias del mismo, las CDKs asociadas y sus inhibidores [Quinn y col., 2005].

La unión de los complejos "ciclina-CDK" es esencial para la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular. Existen varios inhibidores de la actividad catalítica de las CDKs con distintas especificidades. Estos inhibidores actúan como adaptadores en el ensamblaje de los complejos ciclinas/CDKs. El inhibidor universal de las CDKs, p27, interacciona con todos los subtipos de complejos ciclinas/CDKs y en todas las fases del ciclo. Los complejos de las ciclinas D con CDK4 son más estables cuando están unidos a p27^{Kip1} o a p21^{Cip1} y se demostró que la formación de estos complejos ternarios estabiliza a las ciclinas D [Bagui y col., 2003]. La asociación de p27 con los complejos CDK4-ciclina D o con CDK2-ciclina E bloquea la fosforilación de las CDKs respectivas y arresta a las células en G1. Si en estas condiciones las células arrestadas no mueren por apoptosis, entonces deben estar protegidas por algún camino que impide la muerte de las mismas.

Los niveles del ARNm de ciclina E muestran un patrón de expresión periódico, comenzando a sintetizarse durante la fase G1 del ciclo celular, con niveles máximos y acumulación de la proteína en G1 tardío seguidos por disminución

de la expresión posteriormente durante la fase S, enfatizando el rol clave de esta ciclina en el mantenimiento del punto de restricción [Mazumder y col., 2004].

Los complejos CDK4 y CDK6 junto con las ciclinas del tipo D, juegan un papel fundamental en la progresión a través de la fase G1. La ciclina D1 ha sido el foco de mayor atención, ya que su sobre expresión causa el acortamiento de dicha fase, dado que el ensamblaje de la holoenzima ciclina D1/CDK4 es limitante de la velocidad de progresión a través de G1 [Quelle y col., 1993; Resnitzky y col., 1994].

Las situaciones de estrés oxidativo pueden también modificar la expresión de las proteínas relacionadas con el ciclo celular.

Los tumores de próstata muestran niveles aumentados de H_2O_2 , una propiedad que ha sido correlacionada con su potencial metastásico [Lim y col., 2005]. En este contexto parece esencial dilucidar los mecanismos que determinan el comportamiento celular después de un insulto oxidativo. Por esta razón, en esta tesis decidimos estudiar la expresión de algunas de las proteínas regulatorias del ciclo celular en las líneas de PCa sensibles e insensibles a andrógenos crecidas en condiciones de daño oxidativo y tratadas con hemina, el inductor de la expresión de HO-1.

Niveles de expresión de las proteínas regulatorias del ciclo celular en condiciones de daño oxidativo mediado por H_2O_2 y expuestas a hemina

Las células LNCaP y PC3 fueron crecidas en presencia de H_2O_2 200 μ M (1.30 h y 2h, respectivamente) y posteriormente se expusieron a hemina 20 μ M durante 22 horas.

Ninguno de los tratamientos produjo alteraciones en los niveles de expresión de la ciclina D1 en las células LNCaP. Sin embargo, en las células PC3 el tratamiento con H_2O_2 provocó un significativo aumento de la expresión de la ciclina D1 respecto al control, efecto que se exacerbó por posterior exposición a hemina. Es importante resaltar que cuando las células PC3 fueron tratadas con hemina únicamente, se produjo una marcada inducción de la expresión de ciclina D1,

reflejando que la respuesta al incremento de la expresión de ciclina D1 fue máximo cuando las células no fueron previamente expuestas al agente estresor (Fig. 21).

Estos resultados sugirieron que el estrés oxidativo provoca incrementos en la expresión de ciclina D1 y que el tratamiento con hemina provoca la máxima respuesta en estas condiciones experimentales en las células insensibles a andrógenos. En cambio en las células sensibles a andrógenos ni el estrés oxidativo ni la presencia de hemina produjo alteraciones en la expresión de la ciclina D1.

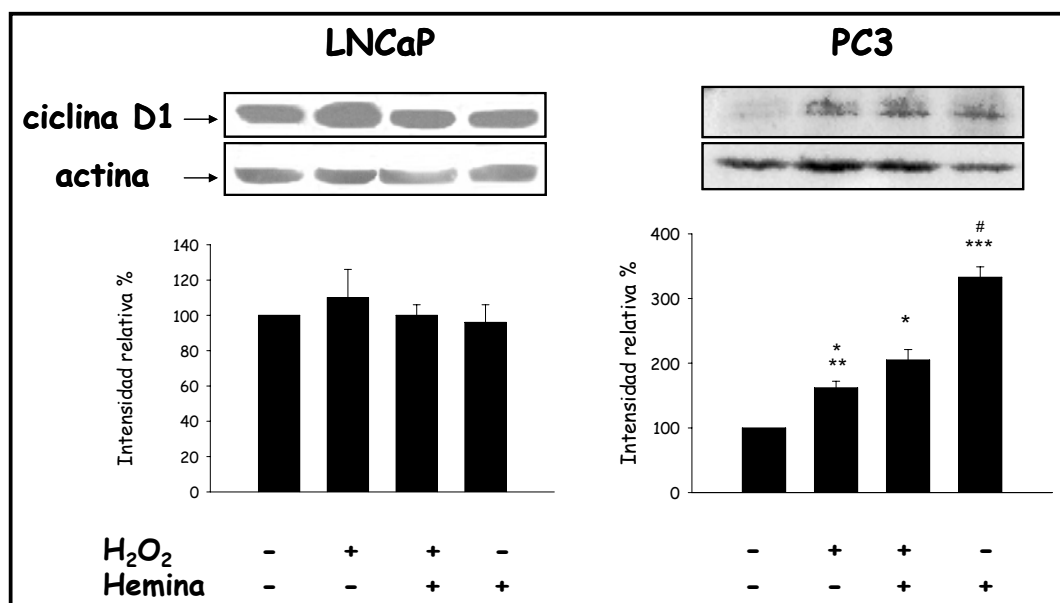


Figura 21. Expresión de ciclina D1 en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína ciclina D1. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego por 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) por 22 h. Las barras representan el análisis densitométrico de los niveles de ciclina D1 normalizados contra actina. Se calculó la media±DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. * $p < 0,01$ y *** $p < 0,05$ vs control, ** $p < 0,01$ y # $p < 0,001$ vs H₂O₂-hemina.

En cuanto a la expresión de ciclina E, la exposición a H₂O₂ produjo un considerable aumento en la expresión de esta ciclina tanto en las células LNCaP

como en las PC3. Cuando los cultivos celulares fueron tratadas posteriormente con hemina, se observó atenuación en la expresión de la proteína en ambas líneas respecto a las células tratadas con H₂O₂ únicamente, alcanzando los niveles basales en las células LNCaP. La exposición a hemina únicamente, indujo la expresión de ciclina E (Fig. 22).

Estos resultados mostraron que el daño oxidativo induce un marcado incremento en los niveles de ciclina E en ambos tipos celulares y el posterior tratamiento con hemina restauró parcialmente los niveles basales de esta proteína. Las células que no fueron expuestas a estrés respondieron a la hemina induciendo la expresión de ciclina E.

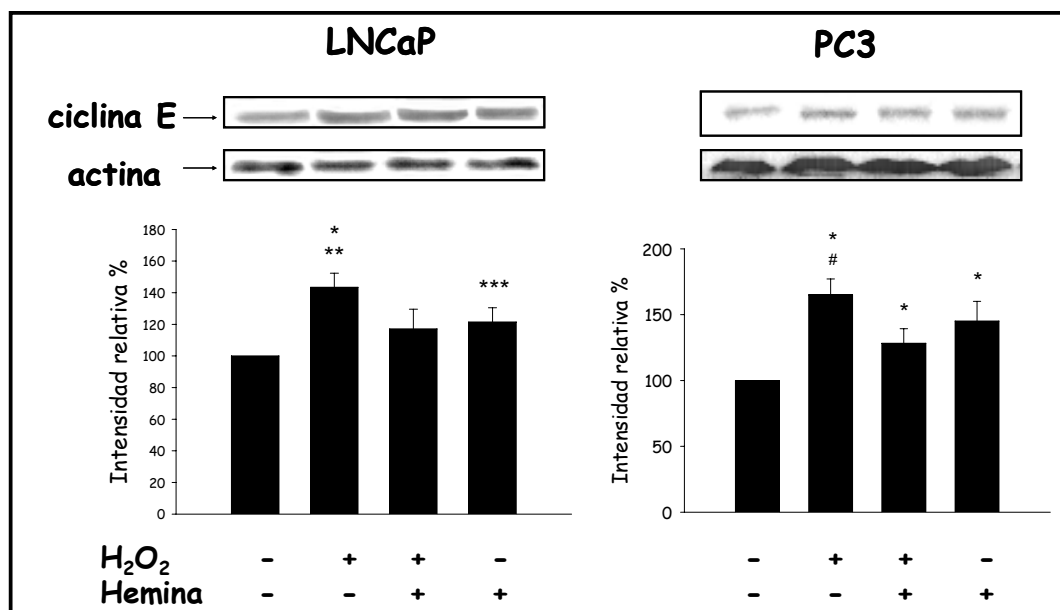


Figura 22. Expresión de ciclina E en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína ciclina E. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego por 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) por 22 h. Las barras representan el análisis densitométrico de los niveles de ciclina E normalizados contra actina. Se calculó la media±DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. **p*<0,001 y ****p*<0,05 vs control, ***p*<0,05 y #*p*<0,001 vs H₂O₂-hemina

En cuanto a la expresión de CDK2, en LNCaP no se observaron cambios significativos cuando las células se expusieron a H₂O₂ o hemina. Sin embargo, hubo un incremento significativo en los niveles de expresión de esta proteína por exposición a H₂O₂ y posterior tratamiento con hemina respecto a las tratadas con el agente oxidante únicamente (Fig. 23).

En las células PC3 el daño oxidativo provocó un importante aumento del nivel de expresión de CDK2, efecto que fue revertido por el posterior tratamiento con hemina, alcanzando niveles similares al control. La presencia de hemina en los cultivos no expuestos al agente oxidante no modificó los niveles de CDK2 (Fig. 23).

Estos resultados mostraron una respuesta diferencial de la expresión de CDK2 en las líneas sensibles o insensibles a andrógenos frente al estrés oxidativo.

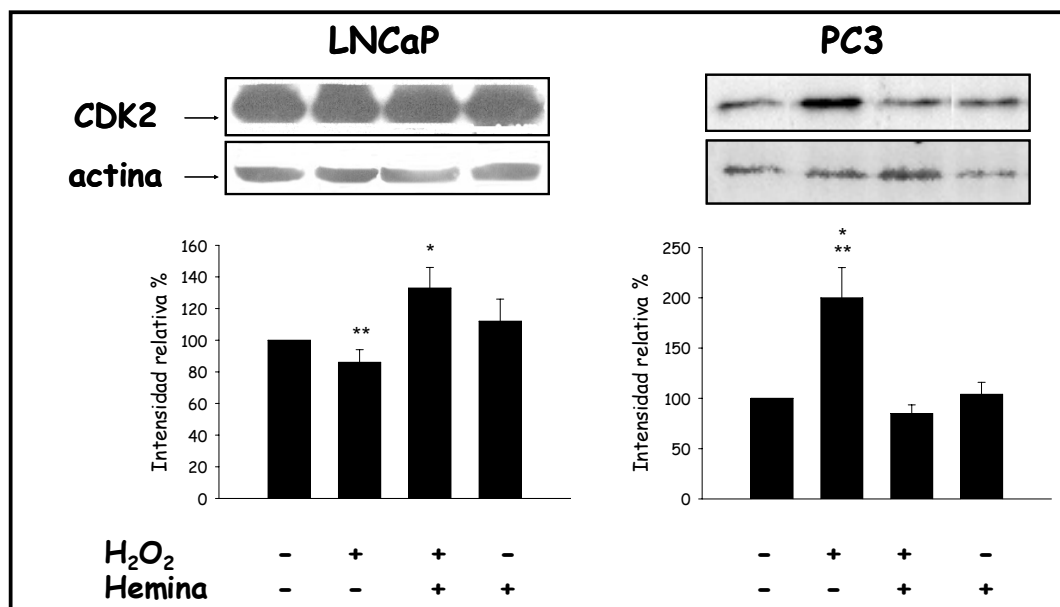


Figura 23. Expresión de CDK2 en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína CDK2. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego por 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) por 22 h. Las barras representan el análisis densitométrico de los niveles de Cdk2 normalizados contra actina.

Se calculó la media \pm DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que fue considerado 100%. * p <0,001 vs control, ** p <0,001 vs H₂O₂-hemina.

El nivel de expresión de la proteína CDK4 en las células LNCaP no se modificó por ninguno de los tratamientos realizados. Por el contrario, las células PC3 mostraron un significativo aumento de CDK4 cuando fueron tratadas con H₂O₂ y esta inducción no se modificó por posterior exposición a hemina. La exposición a hemina de los cultivos no sometidos previamente a estrés, indujo la expresión de los niveles de esta proteína (Fig. 24).

Estos resultados mostraron una respuesta diferencial de la expresión de CDK4 en las líneas sensibles o insensibles a andrógenos frente al estrés oxidativo.

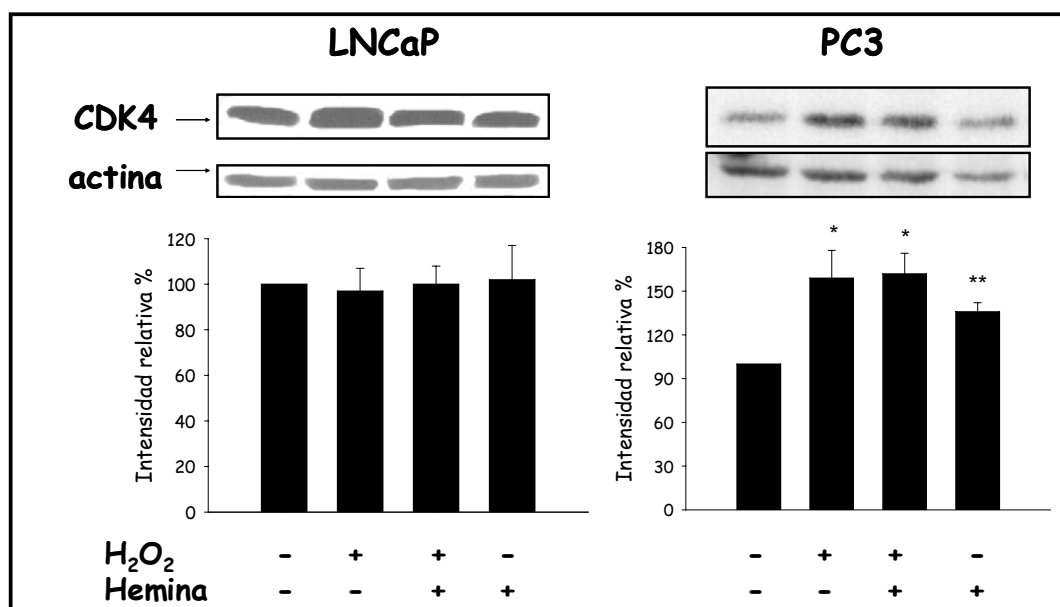


Figura 24. Expresión de CDK4 en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína CDK4. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μ M) y luego por 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μ M); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μ M) por 22 h. Las barras representan el análisis densitométrico de los niveles de Cdk4 normalizados contra actina. Se calculó la media \pm DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que fue considerado 100%. * p <0,001 y ** p <0,05 vs control

El nivel de expresión de la proteína p21 en las células LNCaP no se modificó por ninguno de los tratamientos realizados (Fig. 25). En los cultivos de las células PC3 el tratamiento con H₂O₂ no produjo ninguna variación en la expresión de p21. Sin embargo, el nivel de esta proteína disminuyó por posterior tratamiento con hemina. La presencia de hemina en cultivos no sometidos previamente a estrés indujo la expresión de los niveles de p21 (Fig. 25).

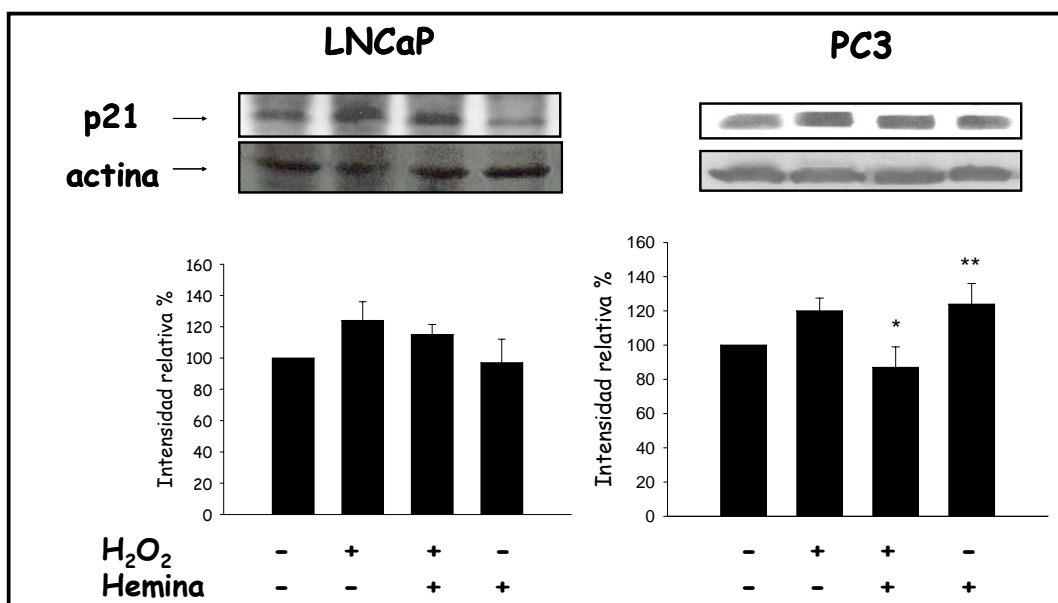


Figura 25. Expresión de p21 en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína p21. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego por 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) por 22 h. Las barras representan el análisis densitométrico de los niveles de p21 normalizados contra actina. Se calculó la media±DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que fue considerado 100%. * $p < 0,01$ vs H₂O₂ y ** $p < 0,05$ vs control.

El daño oxidativo no produjo alteraciones significativas en los niveles de la proteína p21 luego del daño oxidativo en las líneas sensibles e insensibles a

andrógenos. Sin embargo el tratamiento con hemina produjo una respuesta diferencial en ambas líneas sobre la expresión de p21.

El nivel de expresión de la proteína p27 en las células LNCaP no se modificó por el tratamiento con el oxidante y tampoco por su posterior exposición a hemina. Sin embargo, el tratamiento con hemina únicamente provocó disminución de esta proteína (Fig. 26). En las células PC3 la expresión de p27 se incrementó marcadamente luego del daño oxidativo; el tratamiento posterior con hemina produjo una disminución de dicha inducción, pero los niveles se mantuvieron aumentados respecto al control. La sobre expresión de p27 también se observó por tratamiento con hemina únicamente (Fig., 26).

El daño oxidativo elevó en forma dramática los niveles de p27 en las células insensibles a andrógenos.

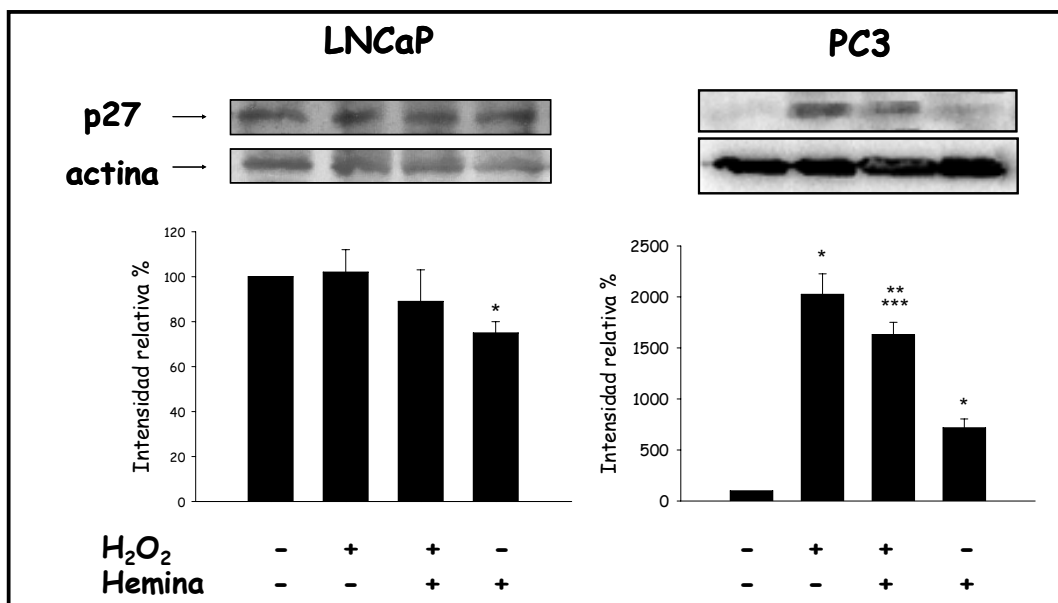


Figura 26. Expresión de p27 en células PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Western blot representativos que muestran la expresión de la proteína p27. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego por 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) por 22 h. Las barras representan

el análisis densitométrico de los niveles de p27 normalizados contra actina. Se calculó la media \pm DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que fue considerado 100%. * $p < 0,001$ vs control, ** $p < 0,05$ vs H₂O₂, *** $p < 0,001$ hemina.

Nuestros datos sugieren que la regulación de las proteínas de los puntos de chequeo del ciclo celular analizadas en este estudio bajo condiciones de estrés oxidativo y/o presencia de hemina ocurre por caminos distintos en células LNCaP y PC3 y por lo tanto dicha regulación es dependiente del tipo celular.

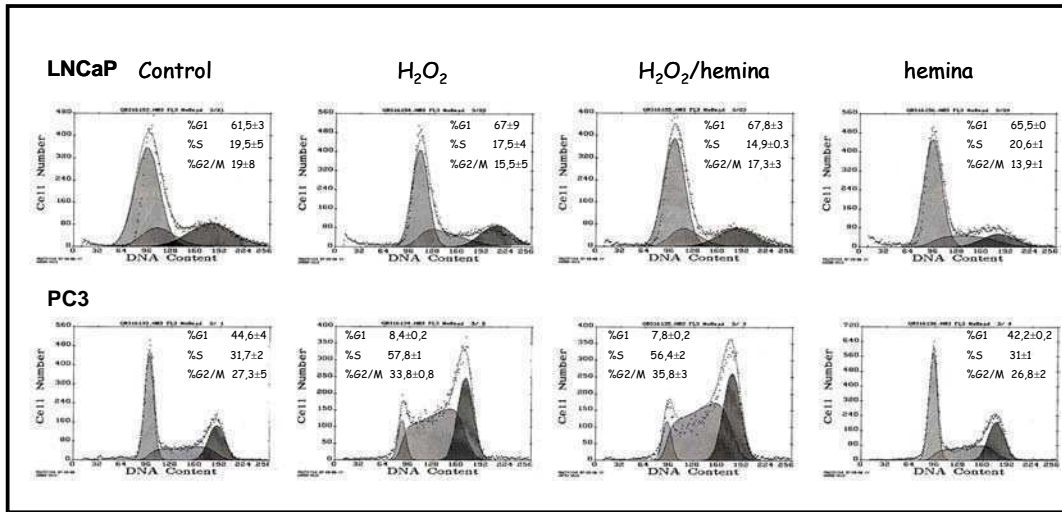
Efecto de la modulación de HO-1 en la distribución del ciclo celular

Para analizar si la inducción del daño oxidativo y la modulación de la expresión de HO-1 producía algún efecto sobre la progresión del ciclo celular, las líneas LNCaP y PC3 se sometieron a análisis de la distribución de la población celular por citometría de flujo usando ioduro de propidio (**Fig. 27 A**).

En las células LNCaP ninguno de los tratamientos analizados modificó el perfil de distribución celular. Sorpresivamente, en las células PC3 la exposición a H₂O₂ mostró una distribución predominante en la fase S a expensas de la disminución de la población celular en la fase G1. También se detectó un aumento en el porcentaje de células en G2/M. El posterior tratamiento con hemina no modificó esta distribución. Cuando las células fueron tratadas únicamente con hemina se mantuvo el mismo perfil de distribución en las distintas fases del ciclo celular que en las controles (**Fig. 27 B**).

Los resultados muestran que en las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio, las células LNCaP se encontraron acumuladas principalmente en G1, sin modificarse esta distribución bajo ningún tratamiento. En las células PC3 los mismos tratamientos coordinan un set de eventos moleculares distintos que conducen a la acumulación de las células en la fase S y arresto en la fase G2/M bajo condiciones de estrés oxidativo.

A



B

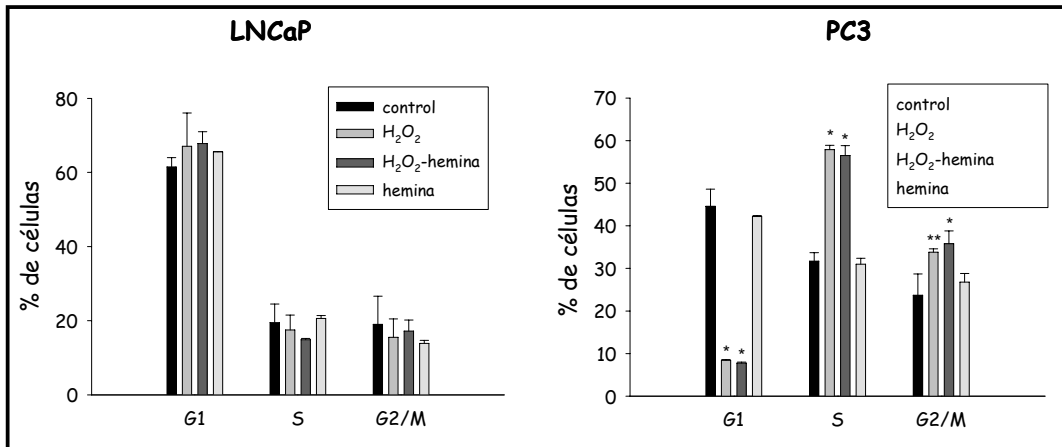


Figura 27. Distribución de las células LNCaP y PC3 en las distintas fases del ciclo celular cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

A) Distribución del ciclo celular en los cultivos de células de PCa por citometría de flujo utilizando ioduro de propidio. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego por 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) por 22 h. B) Las barras representan el % de células en las fases indicadas como la media±DS de tres experimentos independientes. **p*<0,001 y ***p*<0,01 vs control

Expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis Bcl-2 y Bax

Para analizar si la inducción del daño oxidativo y la modulación de la expresión de HO-1 afectaba la apoptosis, estudiamos la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-2 y de la proteína pro apoptótica Bax en las líneas LNCaP y PC3.

En los cultivos de células LNCaP observamos que la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-2 disminuye por tratamiento con H₂O₂ y esta disminución no se modificó por posterior tratamiento con hemina. No se observaron alteraciones en el nivel de expresión de Bcl-2 por exposición a hemina únicamente, respecto al control. En las células PC3 el tratamiento con H₂O₂ indujo significativamente el nivel de Bcl-2, y el posterior tratamiento con hemina produjo aumentos adicionales en estos niveles. La exposición de las células a hemina únicamente, condujo a la sobre expresión de esta proteína.

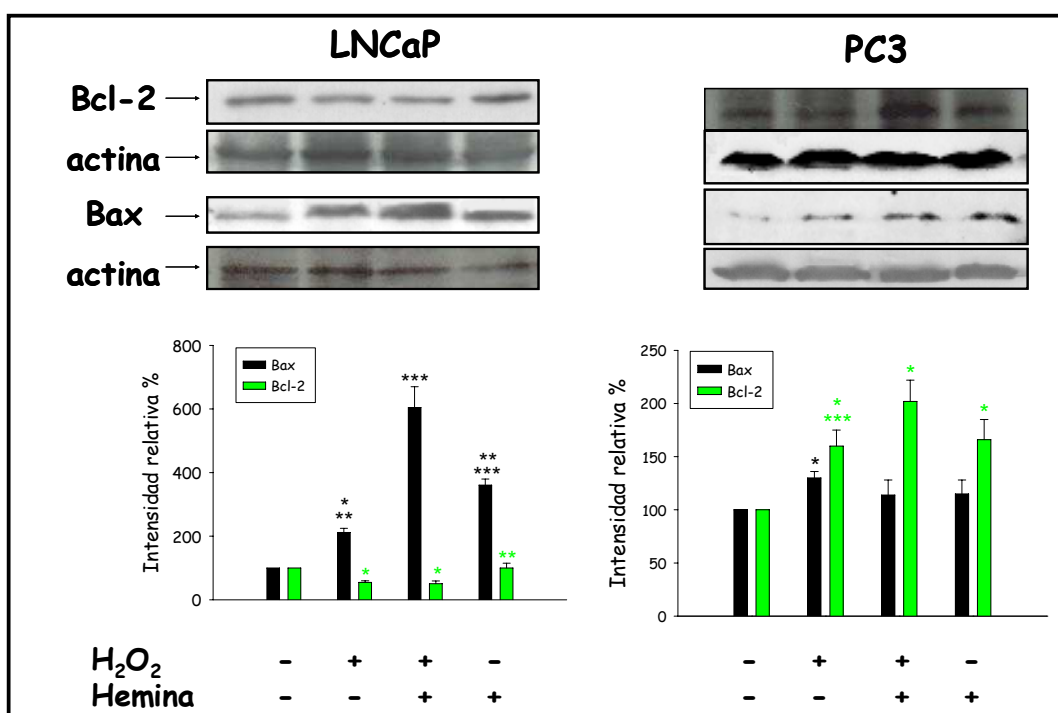


Figura 28. Expresión de Bcl-2 y Bax en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Western blot representativos que muestran la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) durante 22 h. Las

barras representan el análisis densitométrico de los niveles de Bax normalizados contra actina. Se calculó la media \pm DS de tres experimentos y se graficó como porcentaje respecto al control que fue considerado 100%. *, *** $p < 0,001$ y * $p < 0,05$ vs control, **, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,05$ vs H₂O₂-hemina.

En cuanto a la expresión de Bax en las células LNCaP, el tratamiento con H₂O₂ y/o hemina indujo significativamente los niveles de esta proteína pro apoptótica, incluso se observó un efecto sinérgico entre ambos tratamientos (Fig. 28).

En las células PC3 la expresión de la proteína Bax se indujo por exposición al H₂O₂. El posterior tratamiento con hemina restauró los niveles basales. No se observaron alteraciones en los niveles de Bax respecto al control cuando las células se expusieron a hemina únicamente (Fig. 28)

Estos resultados mostraron que en las células LNCaP tratadas con H₂O₂ la relación Bcl-2/Bax desplaza el balance entre la muerte y la supervivencia hacia la apoptosis. Este desbalance es aún mayor luego del tratamiento con hemina. En las células PC3 la relación Bcl-2/Bax sugiere un balance a favor de la supervivencia en condiciones de estrés inducido con H₂O₂ y esta tasa se incrementa cuando las células son tratadas posteriormente con hemina.

En resumen el daño oxidativo produjo un desplazamiento diferencial del balance Bcl-2/Bax en células sensibles e insensibles a andrógenos.

Ensayo de actividad de caspasa-3

Mediante el ensayo de actividad de caspasa-3 usando como sustrato Ac-DEVD-pNA observamos que no hay inducción significativa de caspasa-3 en las células LNCaP bajo ninguna de las condiciones estudiadas.

En cambio, en las células PC3 se detectó una inhibición significativa de la actividad de esta caspasa respecto al control con todos los tratamientos estudiados (Fig. 29).

Nuestros resultados muestran que la apoptosis en células LNCaP no está mediada por caspasa-3. En las células PC3 la disminución de la actividad de esta

caspasa estuvo de acuerdo con el aumento de la tasa Bcl-2/Bax, sugiriendo una disminución de la muerte celular.

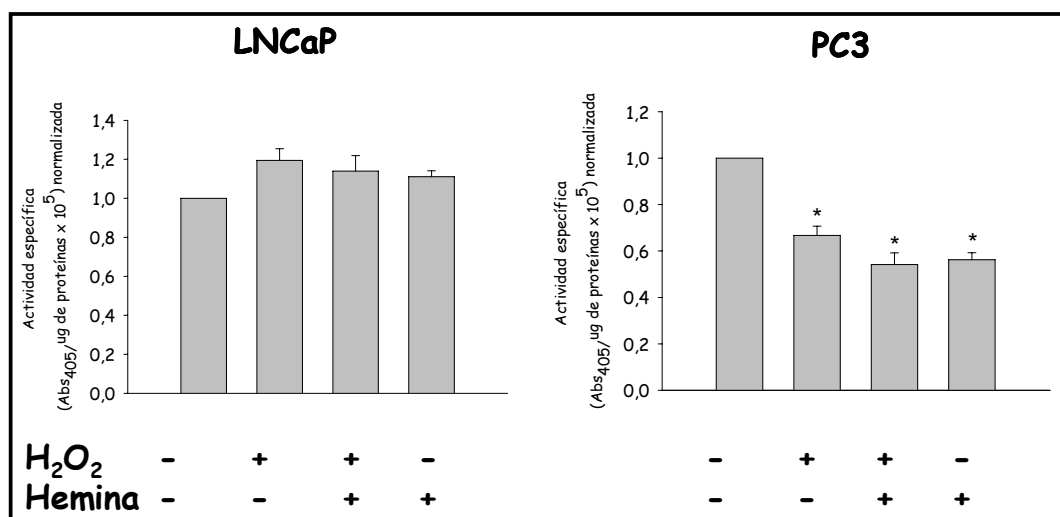


Figura 29. Actividad de caspasa-3 en células LNCaP y PC3 cultivadas *in vitro* luego de inducir daño oxidativo y expuestas a hemina

Gráficos representativos de la actividad de caspasa-3, medida colorimetricamente a una absorbancia de 405 nm. Las células se incubaron con H₂O₂ (200 μM) y luego 22 h con medio de cultivo fresco o con hemina (20 μM); otro grupo de células fue expuesto a hemina (20 μM) durante 22 h. La actividad específica se expresó como la A₄₀₅/μg de proteínas x 10⁵ y se normalizó respecto al valor control considerado 1. Las barras representan la media±DS de tres experimentos.

DISCUSSION

DISCUSION PARTE 1. Estudios *ex vivo*

Estudio de la expresión y localización de Hemo oxigenasa-1 en pacientes con cáncer de próstata. Utilidad como biomarcador

Históricamente HO-1 se caracterizó por su localización en el retículo endoplasmático [Tenhunen y col., 1969]. A pesar de que el conocimiento actual de la compartimentalización de HO-1 permanece muy limitado, algunas investigaciones documentaron diferentes localizaciones de las isoformas de HO [Parfenova y col., 2001; Kim y col., 2004; Converso y col., 2006; Slebos y col., 2006; Lin y col., 2007] relacionadas probablemente con funciones selectivas en cada tipo celular. Así, la relevancia biológica de la compartimentalización de HO-1 no está totalmente entendida pero la complejidad de los patrones de inmuno-reactividad sugiere que la localización está regulada.

Nuestros resultados muestran que mientras la proteína HO-1 se encuentra exclusivamente en el citoplasma de algunas células, en otras esta proteína está localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo en las muestras de PCa y BHP (Fig. 12).

Otros investigadores también han mostrado localización nuclear de HO-1. Tal como otras proteínas que responden a shock térmico (HSP) el transporte hacia el núcleo podría involucrar la interacción de señales de localización nuclear de la enzima con el complejo del poro nuclear [Segui-Simarro y col., 2003] o con otros componentes citoplasmáticos que podrían transportar la proteína [Suttner y col., 1999]. En cultivos primarios de células astrogiales se observó que la translocación hacia este compartimiento podría ser parte de mecanismos involucrados en el desarrollo del cerebro tanto como en enfermedades neurodegenerativas, sugiriendo que esta proteína podría modular caminos de transducción de señales y funcionar como un importante mecanismo para la regulación de factores nucleares de transcripción [Li Volti y col., 2004; Lin y col., 2007]. En distintas condiciones de estrés inducido, también se observó sobre expresión de HO-1 en el núcleo en distintos tipos celulares. En células fetales de pulmón de rata transfectadas con

ADNc de HO-1 y expuestas a hiperoxia, se observó aumento del nivel de HO-1 seguido de migración hacia el núcleo, proponiendo que esta proteína podría servir como una chaperona o mensajero nuclear [Suttner y col., 1999] [33]. Giordano y col. [Giordano y col., 2000] usando ratas expuestas al frío mostraron un aumento de núcleos teñidos para HO-1 en tejido marrón adiposo y propusieron que los productos secundarios de HO-1 serían capaces de modular genes involucrados en la adipogénesis.

Si bien hay diversos estudios que han relacionado la sobre expresión de HO-1 con el cáncer [Prawan y col., 2005], no hay reportes que asocien esta proteína con su translocación nuclear.

Shibahara y col. [2003] concluyen que en determinadas condiciones fisiológicas la represión transitoria de la expresión de HO-1 sería una estrategia potencial de defensa en los humanos y resaltan que HO-1 tendría un rol regulatorio sobre su propia expresión. En cambio, existen reportes contradictorios acerca de la expresión de HO-1 y la citoprotección de las células en los tumores. Diferentes cánceres humanos expresan altos niveles de HO-1 [Goodman y col., 1997; Nishie y col., 1999; Torisu-Itakura y col., 2000; El Andaloussi y Lesniak, 2007] y en varios modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* su inhibición condujo a un reducido crecimiento tumoral [Doi y col., 1999; Fang y col., 2003; Sunamura y col., 2003; Berberat y col., 2005; Marinissen y col., 2006; Hirai y col., 2007]. Sin embargo, nosotros previamente demostramos que la disminución de la expresión de HO-1 se correlacionaba con progresión maligna en un modelo experimental de hepatocarcinoma inducido químicamente [Caballero y col., 2004; Sacca y col., 2004]. Además, en carcinoma oral de células escamosas (SCC) alta inmunotinción de HO-1 se correlacionó con ausencia de metástasis de nódulos linfáticos [Tsuji y col., 1999].

En esta tesis demostramos por primera vez que la expresión de HO-1 y la localización nuclear están asociadas con carcinogénesis y pueden definir un sub grupo de pacientes con PCa primario (**Fig. 12, Tabla 4 y 5**). El riesgo relativo de encontrar un tumor *vs* un BHP con marcación nuclear positiva para HO-1 es de

aproximadamente 3,5 mientras que el riesgo relativo es alrededor de 1,8 cuando se compara el tumor con el parénquima no neoplásico de la misma muestra. Si bien la asociación entre la marcación nuclear de HO-1 y el grado de Gleason mostró una diferencia "*casi significativa*" (Tabla 6) es importante este dato, ya que tendría valor predictivo, teniendo en cuenta que en PCa los pacientes con Gleason 5-6 son una población notoriamente difícil para predecir la evolución de la enfermedad [Kirschenbaum y col., 2006]. Así podría determinarse cuales pacientes con Gleason 5 o 6 podrían ser considerados para "*watchfull and waiting*" (observación y espera) y cuales debieran someterse a tratamiento. Del mismo modo para pacientes con Gleason 3+4 y 4+3 la conveniencia de realizar prostatectomía radical o radioterapia. Futuros trabajos determinarán la validez de este biomarcador.

No observamos diferencias en la cantidad de casos con marcación citoplasmática de HO-1 entre el tumor, el parénquima no neoplásico y la BHP. Tampoco hubo diferencias cuando se comparó la cantidad de casos con esta localización y el grado de Gleason.

El desbalance prooxidante/antioxidante en pacientes con PCa conduce a un aumento del daño oxidativo jugando un rol importante en la carcinogénesis de la próstata [Yilmaz y col., 2004; Aydin y col., 2006]. La eficacia de los tratamientos para el cáncer no solo depende del daño celular que provocan, sino también de la capacidad de las células tumorales de responder a dicho daño por inducción de la maquinaria apoptótica [Liu y col., 2004]. Por lo tanto, si HO-1 actúa como respuesta adaptativa del sistema de defensa celular en el PCa, su movimiento desde el citoplasma hacia el núcleo podría tener un impacto sobre la capacidad de esta proteína de cumplir otras funciones, probablemente relacionadas con las actividades de reparación del ADN, de tal forma que clones de células tumorales modifiquen su fenotipo oncogénico. Es admitido que la población celular dentro de un cáncer primario es heterogénea y que solamente un grupo de células malignas son capaces de invadir y diseminarse con éxito. De todas maneras es necesaria una profunda investigación sobre los componentes nucleares que interactúan con HO-1 para entender mejor los mecanismos de acción de esta proteína en el

compartimiento nuclear. Además los resultados presentados no descartan algún estímulo desconocido que podría conducir a la localización nuclear de HO-1.

Nuestros resultados sugieren que la expresión nuclear de HO-1 sería un factor clave para la adquisición de fenotipos malignos y metastásicos mientras que células tumorales que expresan HO-1 citoplasmática serían menos agresivas. Las bases moleculares que subyacen a estas observaciones deben ser investigadas y son importantes no solo para entender mejor la regulación del crecimiento del tumor, sino también en la práctica clínica ya que podrían constituir las bases de futuras terapias antitumorales, a través de la modulación de la expresión de HO-1 usando estrategias genéticas o farmacológicas, beneficiando así a pacientes con PCa.

DISCUSION PARTE 2 y 3. Estudios *in vitro*

PARTE 2. Estudio de la expresión y localización de Hemo oxigenasa-1 en células de cáncer de próstata en condiciones basales, sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor o a un inhibidor de dicha proteína

Una serie de estudios epidemiológicos y observaciones de laboratorio sugirieron que en la próstata, el estrés oxidativo puede estar relacionado con los efectos de los andrógenos, con el sistema antioxidante, con la condición premaligna y con la neoplasia intraepitelial de alto grado (HIGPIN) [Pathak y col., 2005]. Los individuos eunucos o deficientes en 5- α reductasa no desarrollan PCa. Además las dietas con alto contenido en grasas están asociadas con altos niveles de andrógenos [Hamalainen y col., 1984]. Se demostró que estas hormonas producían un efecto indirecto en la genotoxicidad por aromatización del 17- β -estradiol, el cual causaba daño al ADN en la próstata dorso lateral de la rata [Han y col., 1995]. También se observó que los niveles fisiológicos de andrógenos eran capaces de aumentar el estrés oxidativo en las células de carcinoma de próstata sensibles a andrógenos LNCaP, pero no en las PC3 [Ripple y col., 1997; Sun y col., 2001]. Los niveles de ROS son marcadamente más bajos en las células PC3 que en la línea celular LNCaP y esto puede estar relacionado a la sensibilidad a los andrógenos. Los sistemas antioxidantes elevados pueden ser parcialmente responsables de los bajos niveles de ROS en las células PC3 [Lim y col., 2005]. Los andrógenos alteran los niveles de glutathion intracelular y la actividad de ciertas enzimas detoxificantes, tal como γ -glutamyl transpeptidasa, que son importantes para el mantenimiento del balance celular prooxidante-antioxidante [Ripple y col., 1997]. A pesar de que la producción de ROS puede acelerar la proliferación celular y la invasión, se sugiere que el control o detoxificación de las ROS es necesaria para la sobrevivencia celular, ya que un alto contenido de ROS puede inducir injuria en la célula, acompañada por daño al ADN, lípidos y proteínas [Lim y col., 2005]. Con la

edad declina la capacidad de los órganos para generar antioxidantes. Es importante tener en cuenta que en el proceso de malignidad ocurren cambios en el conjunto de los sistemas antioxidantes, lo que conduce a una adaptación al estrés oxidativo persistente.

En base a estas observaciones, nuestros resultados demuestran que la expresión disminuida de HO-1 en células más indiferenciadas se debería al aumento adaptativo a la conocida tolerancia de las células PC3 a los agentes oxidantes.

En modelos experimentales se comprobó que en los animales castrados la expresión de HO-1, tanto a nivel de proteínas como a nivel transcripcional, estaba marcadamente disminuida respecto al grupo control mientras que en los animales tratados exógenamente con andrógenos HO-1 fue mucho más alta que en los controles. Los estrógenos, a su vez, aumentaron el nivel de la proteína HO-1 en el estroma de la próstata. Estos hallazgos sugirieron que la expresión de HO-1 era inducida por hormonas sexuales y se ha especulado que el sistema CO/HO posiblemente estaba involucrado en el proceso patológico de proliferación anormal inducida por hormonas sexuales [Tian y col., 2004].

Estos datos avalan nuestros resultados sobre el mayor nivel de expresión de HO-1 en células sensibles a andrógenos, LNCaP.

Varios estudios de los últimos años han mostrado que las enzimas antioxidantes están involucradas en la carcinogénesis de la próstata [Arbiser y col., 2002; Venkataraman y col., 2004], y en la resistencia a la quimioterapia [Jung y col., 1997; Suzuki y col., 2000]. Por otro lado Kweon y col. [2006] reportaron que la expresión constitutiva de HO-1 juega un rol primario en aumentar la quimio resistencia de las células de cáncer de pulmón (A549) y Tsuchihashi y col. [2006] demostraron utilizando el modelo de daño por isquemia/reperfusión que el nivel basal de HO-1, más que su grado de sobre expresión, era crucial en la protección antioxidante. Mientras HO-1 es un gen críticamente importante en citoprotección, el grado de inducción en respuesta a un insulto puede servir como un marcador de daño. La respuesta protectora de HO-1 puede ser superada por encima de un nivel de daño, al punto que la inducción de

HO-1 sea insuficiente para disminuir dicho daño. Esto se evidenció por un aparente efecto umbral a un dado nivel alto de HO-1, después del cual un aumento posterior en la expresión de HO-1 no se tradujo en mayor protección celular [Tsuchihashi y col., 2006].

Estas observaciones abren la posibilidad de desarrollar tratamientos para el cáncer basados en la modulación del estrés oxidativo. Por lo tanto consideramos importante investigar la relación que existe entre el estrés oxidativo y sus mecanismos de defensa de acuerdo con el nivel de malignidad, dado que podrían ser de utilidad para obtener blancos razonables para terapias anti cáncer.

Las células que tienen una producción rápida de H_2O_2 y una capacidad enzimática alta en removerla, son probablemente más resistentes al H_2O_2 exógena [Chen y col., 2001]. *Nuestros estudios han demostrado sensibilidad diferencial en LNCaP y PC3 al H_2O_2 . Observamos que las células PC3 son más sensibles al daño oxidativo mediado por H_2O_2 que las LNCaP.* En particular, en muchas células de diferentes tumores, se ha demostrado que el H_2O_2 modula múltiples y frecuentes caminos distintos de transducción de señales. La explicación para esta observación no es clara, pero puede deberse al estado oxidativo diferencial impuesto por el H_2O_2 en distintos tipos celulares, o a la expresión específica de las enzimas endógenas de defensa antioxidante de acuerdo al tipo celular. Bajo las mismas condiciones de exposición a estrés, células de melanoma, keratinocitos, fibroblastos y células endoteliales mostraron diferentes respuestas de la sobrevivencia celular [Was y col., 2006], lo cual no resulta sorprendente, ya que está bien documentado que la expresión de enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa está reducida en un rango importante de tumores, a pesar de los altos contenidos de ROS en dichos sistemas [Yamanaka y Deamer, 1974; Hasegawa y col., 2002; Hasegawa y col., 2003].

Por lo tanto, resulta evidente que la sensibilidad al estrés oxidativo es dependiente del tipo celular y está relacionada con la dependencia a hormonas.

El hemo libre se incorpora rápidamente dentro de los dominios hidrofóbicos intracelulares, produciendo células hipersuceptibles a daño oxidativo mediado por

citólisis. Se comprobó en células HUVEC que una exposición prolongada a hemo, estimulaba la síntesis de ARNm y de proteína HO-1, la cual al abrir el anillo de porfirina y liberar hierro hémico, induce la síntesis ferritina, que actúa como quelante del hierro. Esta última proteína suprimió notablemente el daño oxidativo inducido por H_2O_2 [Balla y col., 1992]. Las células de cáncer de mama (BT-20), pulsadas brevemente con hemo se volvieron hipersuceptibles al daño mediado por el oxidante H_2O_2 . Sin embargo, la sensibilidad a la lisis mediada por H_2O_2 de estas células tumorales fue menor que en las HUVEC [Cermak y col., 1993]. La línea celular (Caco-2) manifestó un insignificante aumento de la citotoxicidad cuando se expuso a hemo por un período corto. Se especuló que esta resistencia podía reflejar un contenido de ferritina endógeno relativamente alto. El hecho de que la citoprotección esté generada por la posterior inducción de la síntesis de ferritina por exposición al hemo en ambas líneas celulares, sugiere que el hierro libre jugaría un rol crítico en este efecto [Cermak y col., 1993]. Güner y col. [Guner y col., 1992] demostraron que los niveles de ferritina citosólica eran 5 veces más altos en células de cáncer de mama en estadio II y III respecto a los niveles en los cánceres en estadio I; sugiriendo que la ferritina celular puede conferir protección frente a células inmunes o a oxidantes derivados de la quimioterapia. Recientemente, se reportó que en la línea RAW 264.7, el tratamiento con hemo condujo a un mayor incremento en la síntesis de ferritina en las células que sobre expresaban HO-1 respecto a las células controles. Sin embargo, la inducción de HO-1 por agentes no hémicos no condujo a la liberación del hierro proveniente del hemo endógeno. Los autores sugirieron que la protección ejercida por HO-1 no requiere del catabolismo de cantidades significativas de hemo y demostraron que en condiciones normales no hay sustrato hemo disponible para HO-1 en estas células. Por lo tanto, propusieron que la protección tisular a través de esta enzima es probablemente vía un mecanismo aún desconocido [Sheftel y col., 2007]. Más aún, la transfección con una forma mutante e inactiva de HO-1 resultó en citoprotección contra el daño causado por estrés oxidativo inducido químicamente, y este efecto no era atribuible a cambios en los catabolitos del hemo, aludiendo a

un rol de HO-1 como proteína en si misma [Hori y col., 2002]. También las metaloporfirinas, inhibidores de la actividad de HO, son inductores de su expresión. Recientemente, Abate y col. [2007] demostraron que estaño meso porfirina (SnMP), una metaloporfirina análoga a SnPP, se une a la región de unión a hemo de Bach1, y causa su disociación del complejo de unión al ADN liberando al sitio MARE de la represión dentro del promotor de HO-1 y activando la expresión del gen. Así, SnMP causó un aumento en la transcripción del gen y de la proteína HO-1 con una concomitante disminución en la abundancia nuclear de la proteína Bach1. Este proceso de inducción de HO-1 por SnMP parece involucrar tanto la de-represión del promotor de HO-1 por unión a Bach1 como la aceleración de la degradación de Bach1. En cambio, la inhibición de la actividad de HO-1 por SnMP es vía la inhibición competitiva de la enzima.

En nuestras condiciones experimentales fue posible inducir la expresión de HO-1 en ambas líneas celulares por efecto del tratamiento con H₂O₂ y/o hemina y/o SnPP. En las células PC3 demostramos que la inducción de HO-1 desencadenó un efecto protector sobre las células expuestas a injuria oxidativa.

Se ha reportado un aumento de la sobrevivencia celular en un amplio rango de concentraciones de peróxido de hidrógeno en clones de células ECV304 transfectadas con HO-1 y con un nivel intermedio de expresión de la proteína [Maruhashi y col., 2004].

En las condiciones experimentales en las que realizamos este estudio, no se observó ningún efecto de HO-1 sobre la modulación del daño oxidativo en los cultivos de las células LNCaP; sin embargo, en la línea celular PC3 el efecto es notable, y podría deberse al mayor nivel de inducción de HO-1 alcanzado respecto a las células LNCaP.

Concluimos que hay un umbral de sobre expresión de HO-1; en este punto se produce normalización o control de la generación de las ROS. Pero tomando en cuenta que tanto el inhibidor como el activador de HO-1 aumentan la viabilidad en células PC3, parecería entonces que el efecto sobre la viabilidad ejercido por la sobre expresión de HO-1 se debería a la presencia de la proteína en si misma y no a

los productos de su actividad. Sin embargo, esta última posibilidad no puede descartarse considerando el excesivo nivel de inducción que se logra con hemina en las células insensibles a andrógenos.

Cabe aclarar, que hemos observado en células PC3 un leve desplazamiento de la banda de HO-1 cuando las células se trataron con SnPP. Asimismo, pudimos observar bandas de mayor PM en las células LNCaP en todos los extractos. Es posible que HO-1 sufra modificaciones post traduccionales, como la fosforilación, bajo la acción de ciertos estímulos. Este hecho no se pudo comprobar en esta tesis dado que hasta la fecha no existe anticuerpo comercial contra la forma fosforilada de la proteína.

El análisis inmunocitoquímico mostró que HO-1 se encontraba localizada en el citoplasma de las células LNCaP y PC3. La exposición a H₂O₂ indujo la expresión de HO-1 en el citoplasma de ambas líneas celulares. La inducción de la expresión de HO-1 por tratamiento con hemina condujo también a localización citoplasmática de HO-1 pero sorpresivamente observamos además localización nuclear de la misma en ambos casos. Estos resultados se confirmaron por análisis de western blot de la expresión de HO-1 al aislar las fracciones nucleares y citoplasmáticas.

Lin y col., [2007] acaban de reportar señal de inmuno-reactividad de HO-1 en el núcleo de fibroblastos NIH3T3 y en células de hepatoma de ratón en cultivo bajo exposición a hipoxia y hemina. Bajo estas condiciones, detectaron enriquecimiento en los extractos nucleares de una banda que migraba más rápidamente sugiriendo que ésta proteína era clivada en el extremo C-terminal para permitir su entrada al núcleo. Los autores propusieron que la proteína HO-1, independientemente de que fuese activa o no, mediaba la activación de los factores de transcripción respondedores a oxidantes incluyendo AP-1 y que tanto la proteína nuclear como la citoplasmática protegían del daño provocado por H₂O₂. Se postuló que HO-1 puede inducir genes que promueven la citoprotección contra estrés oxidativo.

Hasta la fecha no se ha publicado que HO-1 contenga secuencias de localización nuclear (NLS). Además de las NLS, las secuencias de exportación

nuclear (NES) son importantes para la apropiada localización de algunas proteínas citoplasmáticas. Ningún investigador ha reportado si HO-1 tiene una NES funcional. Se ha descrito una región altamente conservada de la proteína HO-1 de rata entre los aminoácidos 207-221 (NIELSEELQALL) con una homología mayor al 90% al motivo NES [LX₍₁₋₃₎LX₍₂₋₃₎LXL] de la proteína Rev del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-Rev) la cual se une al preARNm de HIV-1 que no sufrió splicing y exporta esta proteína desde el núcleo [Henderson y Percipalle, 1997].

Sin embargo, debe tenerse presente que proteínas con masa molecular relativa entre 40-60 kDa pueden difundir libremente a través del complejo del poro nuclear [Nigg, 1997; Ohno y col., 1998] así como también pequeñas proteínas (menores a 50 kDa) que perdieron la NLS pueden migrar hacia el núcleo [Macara, 2001].

Hay varios casos reportados de enzimas citoplasmáticas que cumplen funciones en el núcleo. Por ejemplo la proteína de unión al elemento regulador esteroideo (SREBP) está usualmente unida al retículo endoplasmático (RE) a través de su extremo C-terminal y se localiza en el núcleo después de clivaje proteolítico [Feramisco y col., 2004]. La fosfolina cididilil transferasa es activa cuando se une al RE, pero es enzimáticamente inactiva en el núcleo [Cornell y Northwood, 2000]. El factor de transcripción ATF6 es un glicoproteína transmembrana que está usualmente unida al RE, pero puede ser clivada en su N-terminal y migrar al núcleo en respuesta a estrés [Yoshida y col., 2000].

Estos datos sugieren que HO-1 debería requerir uno o más clivajes proteolíticos para translocarse al núcleo. El residuo C-terminal de HO-1 es corto y reside dentro del lumen del REs. El clivaje tanto del lado citosólico de la región transmembrana y/o también dentro del dominio transmembrana liberaría un fragmento grande de HO-1 conteniendo el N-terminal, con la consecuente disminución de su peso molecular. Experimentos *in vitro* documentaron clivaje tríptico del C-terminal de la proteína HO-1 purificada de microsomas de hígado rata [Yoshida y col., 1991], pero no se sabe aún si esto ocurre en células intactas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y que hay un 80% de homología entre la secuencia del gen *ho-1* de rata y el humano y sabiendo que la regulación de HO-1 es diferente entre estas dos especies, entonces la translocación nuclear de la proteína en humanos podría no necesitar un clivaje y estaría por lo tanto sufriendo otras modificaciones post traduccionales.

Nuestros resultados muestran que en las fracciones nucleares el tratamiento con hemina condujo a un desplazamiento de la banda de HO-1 a un PM mayor, por lo que otros mecanismos, no asociados con el clivaje de esta proteína, estarían en juego en las células tumorales de PCa humano. Así, la efectividad de HO-1 en la transformación maligna probablemente reside en un cambio parcial de su localización subcelular (translocación al núcleo).

La dinámica de la localización subcelular de HO-1 en respuesta a estímulos es mecanísticamente intrigante, y sugiere un nivel de regulación molecular adicional que puede ser explotado como blanco terapéutico. Pensamos entonces que la expresión y localización de HO-1 son importantes para el pronóstico y evaluación del cáncer.

La regulación redox es uno de los mecanismos claves para la adaptación a una variedad de estímulos de estrés, incluyendo el estrés oxidativo. El exceso de generación de ROS causa daño al ADN [Ohshima y col., 2003; Toyokuni, 2006] y conduce a cambios en la información genómica debido al fuerte contrarresto en los enzimas de reparación y los caminos apoptóticos. El daño oxidativo en ciertas secuencias específicas del ADN, las cuales son especialmente vulnerables al estrés oxidativo pueden diferir dependiendo del tipo y el ambiente celular [Toyokuni, 2006], lo que explicaría los caminos de señalización que se encienden o se apagan en cada tipo de cáncer. Así cuando el daño al ADN está involucrado, HO-1 podría contrarrestar el estrés induciendo apoptosis o representar un mecanismo de defensa mutagénico/carcinogénico que protege a las células tumorales que expresan ADN dañado no reparable. Además, es posible que HO-1 pueda modular la proliferación neutralizando y/o previniendo la formación de metabolitos de oxígeno reactivos. Esto es particularmente relevante para células proliferantes con bajos

niveles de enzimas antioxidantes. HO-1 sería un guardián del genoma, limitando mutaciones de ADN y promoviendo la delección de células aberrantes [Oates y West, 2006].

PARTE 3. Estudio de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular y la apoptosis en células de cáncer de próstata sometidas a estrés oxidativo y/o expuestas a un inductor de HO-1

Para defenderse contra el potencial daño inducido por estrés oxidativo, las células proliferantes entran en un arresto del ciclo celular transitorio. Este hecho ha comenzado a llamar la atención en los últimos años pero la naturaleza de dicho arresto y los mecanismos moleculares que subyacen permanecen indefinidos. El mecanismo molecular involucrado en la respuesta al daño oxidativo provocado por el H_2O_2 parece complejo. La respuesta al estrés oxidativo involucra la activación de los puntos de chequeo que alargan la progresión del ciclo celular para proveer tiempo para reparar los componentes celulares dañados (por ej ADN, proteínas y lípidos) y también para activar al sistema de defensa anti oxidante. Estos mecanismos probablemente combinan aspectos de la reparación del ADN y la regulación del ciclo celular. Los avances en ambos campos permitirán una primera aproximación entre los eventos moleculares que ocurren en el ciclo celular y su interacción con la maquinaria de reparación del ADN y el punto de chequeo del daño del mismo, y su contribución a la supervivencia celular.

En varias líneas celulares la exposición a bajas dosis de estrés oxidativo indujo marcado aumento adaptativo en la resistencia al oxidante H_2O_2 . Esta respuesta adaptativa al estrés se ha relacionado con el aumento de la tolerancia a subsecuentes insultos y resistencia a la apoptosis [Chen y col., 2000].

A pesar de que el estrés oxidativo es la principal causa de daño al ADN, aún no es claro en que grado afecta a la inestabilidad genética y la progresión maligna en el PCa establecido. El daño mutagénico oxidativo sobre las bases de ADN aumenta con la edad en el tejido prostático. Distintos factores pueden influenciar este aumento: la producción de ROS, la susceptibilidad al estrés oxidativo, las alteraciones en los niveles de enzimas antioxidantes o defectos en la reparación del ADN. Esto sugiere que el fenotipo maligno de las células PC3 podría estar asociado a los defectos en la reparación de la escisión de bases y la alteración en la

expresión de las enzimas antioxidantes. Un análisis multivariado brindó evidencias de que en PCa, las proteínas del punto de chequeo no prevenían la proliferación de las células neoplásicas, mientras que en BHP, el daño oxidativo en el ADN se correlacionaba inversamente con la expresión de las proteínas del punto de chequeo y la proliferación. A pesar de que en el tejido no neoplásico, un aumento extensivo del daño oxidativo en el ADN conduce a un bloqueo metabólico, en las células neoplásicas de PCa éste activa los mecanismos de reparación, favoreciendo el escape del estado de senescencia y la expansión de clones con ADN dañado [Giovannini y col., 2004].

Dado que los ROS pueden modular positiva o negativamente el crecimiento celular y que la respuesta de las proteínas reguladoras del ciclo frente al estrés oxidativo es variada y dependiente del tipo celular y del grado de estrés provocado, en esta tesis se decidió investigar estos efectos paradójicos, sobre dos fenotipos celulares de PCa, el sensible (LNCaP) y el insensible (PC3) a los andrógenos, planteando la hipótesis de que el estrés oxidativo induciría cambios en el comportamiento celular dependiendo del fenotipo. La comprensión de la respuesta al estrés oxidativo conduciría a obtener mayor información sobre la biología del tumor y los mecanismos que subyacen a la patogénesis del PCa.

Para llevar a cabo este estudio se expusieron células LNCaP y PC3 a H_2O_2 . Se investigó el efecto de la hemina, un inductor de la expresión de la proteína antioxidante HO-1, luego de inducir el daño oxidativo teniendo en cuenta la hipótesis de que esta droga podría producir citoprotección celular.

En esta tesis demostramos que en las células LNCaP, el tratamiento con H_2O_2 no provocó cambios en la expresión de ciclina D1. Sin embargo, se observó aumento de la expresión de ciclina E, p21 y p27. Las CDK 2/4 no sufrieron alteraciones en su expresión bajo este tratamiento. En estas células se observó acumulación en G1 con un perfil de distribución semejante a las células controles. Además encontramos que la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-2 disminuyó, mientras que la expresión de la proteína pro apoptótica Bax aumentó significativamente respecto al control y la tasa Bcl-2/Bax estuvo a favor de la

apoptosis. Sin embargo, no hallamos diferencias en la actividad de caspasa-3 respecto al control. Estos resultados coinciden con los reportados para otros tipos celulares. En fibroblastos humanos estimulados con concentraciones moderadas de H_2O_2 la mayoría de las células se encontraban en la fase G1, reflejando quizás un arresto permanente en esta fase tipo senescencia [Barnouin y col., 2002]. La cinética de la disminución de las ciclinas D y la sobre expresión de p21^{Cip1} coincidía con el arresto del crecimiento inducido por exposición a niveles subletales de este agente (250 μ M), indicando que estas proteínas mediarían dicho arresto de manera transitoria. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión en los niveles de la ciclina E y A, y en CDK2 y CDK4. Fue interesante el hallazgo que p27^{Kip1} disminuyó después del tratamiento y estuvo inversamente correlacionado con el arresto del ciclo celular, sugiriendo que esta proteína no estaba involucrada en dicho proceso [Barnouin y col., 2002]. En células vasculares de músculo liso (VSMs) el tratamiento con concentraciones moderadas de H_2O_2 (100 μ M) causó arresto del ciclo celular en el punto de chequeo G1/S, por bloqueo de la actividad de CDK2, pero sin afectar la de CDK4. Además se observó un aumento de la expresión del ARNm y de la proteína p21 sin cambios en p27 [Deshpande y col., 2002].

En resumen en las células LNCaP el tratamiento con H_2O_2 no produjo alteraciones significativas ni en la expresión de los reguladores del ciclo celular ni en la distribución de las células en las distintas fases de dicho ciclo indicando que estas células se encuentran protegidas frente al estrés oxidativo.

En contraste, en las células PC3 el mismo tratamiento condujo a inducción de la ciclina D1, ciclina E, CDK2/4 y p27, mientras no se observó aumento significativo de p21 respecto al control. En cuanto a su distribución en el ciclo celular, sorprendentemente hallamos que las células PC3 se encontraron acumuladas en la fase S y bloqueadas en G2/M. Por otro lado, las proteínas Bcl-2 y Bax aumentaron; la tasa Bcl-2/Bax estuvo a favor de la supervivencia y observamos inhibición de caspasa-3. El aumento en la expresión de las ciclinas/CDKs justificaría la disminución de la población celular en G1 promoviendo la progresión desregulada de la fase S con pérdida del punto de chequeo G1 [Senderowicz,

2002]. La sobre expresión de ciclina D1 causaría el acortamiento de *G1*, dado que el ensamblaje de la holoenzima ciclina D1/CDK4 es limitante de la velocidad de progresión a través de esta fase [Quelle y col., 1993; Resnitzky y col., 1994]. Otros trabajos encontraron que en fibroblastos el H_2O_2 inhibía reversiblemente la degradación de la ciclina D1 y se propuso que este efecto era producido por la inhibición transitoria de la ubiquitinación de la proteína y/o por la inhibición del proteasoma [Martinez-Muñoz C. y col., 2001]. Del mismo modo en líneas celulares mamarias epiteliales humanas la sobre expresión de ciclina D1 se asoció con prolongación de la fase S [Han y col., 1995]. Además, se ha reportado que niveles altos de ciclina E mediarían la transformación maligna equiparando la actividad constitutivamente alta de CDK2 y anulando los mecanismos de control en el punto de restricción R [Geisen y Moroy, 2002]. Contrariamente a lo que ocurre en células normales en las cuales los niveles de ciclina E bajan rápidamente cuando las células entran en fase S, en las tumorales hay acumulación de ciclina E durante esta fase. Esto puede deberse a un déficit en su degradación, posiblemente debido a mutaciones de los genes involucrados en la ubiquitinación [Erlandsson y col., 2003]. Otra alternativa es que las células tumorales inicien la replicación del ADN prematuramente, y que la ciclina E comience a acumularse antes de que las células entren en la fase S [Erlandsson y col., 2003]. Hay muchos mecanismos posibles que podrían causar la entrada prematura en dicha fase, tales como: mutación de pRb, sobre expresión de la ciclina D o activación oncogénica en una de las cascadas de transducción de señales que regulan la progresión de la fase *G1*. Se sabe que muchas de estas disfunciones ocurren en tumores humanos, y la presencia de tales disfunciones en un tumor está generalmente asociada con pobre supervivencia del paciente [Erlandsson y col., 2003]. Más aún, niveles aumentados de ciclina E durante las fases S o *G2* podrían afectar a las células tumorales causando inestabilidad genómica al alterar la replicación del ADN, sugiriendo que existirían poblaciones celulares que progresan lentamente a través de la fase S. La progresión lenta a través de esta fase está asociada con amplificación génica en células de mamíferos [Erlandsson y col., 2003].

Además, se ha demostrado que la fosforilación de la Tyr¹⁵ de la CDK2 podría tener un rol en la acumulación de la fase S inducida por H₂O₂ [Bartek y Lukas, 2001]. En fibroblastos de embriones de ratón con p21 nulo, el tratamiento con H₂O₂ causó arresto en la fase S, sugiriendo que este agente oxidativo también podía inhibir la actividad de CDK2 por un mecanismo independiente de p21 [Barnouin y col., 2002]. Se requerirán futuros estudios para explorar estos mecanismos independientes de p21 en el arresto del ciclo celular inducido por exposición al H₂O₂.

En cuanto a la proteína p27, ésta cumple múltiples funciones y muestra un patrón de respuestas único a una amplia variedad de señales mitogénicas y anti mitogénicas, lo que la distingue de otros miembros de la familia de inhibidores Cip/Kip. La cantidad de p27 es un factor importante en la regulación del número de células y en el arresto del ciclo celular asociado a diferenciación [Kranenburg y col., 1995; Drissi y col., 1999; Zhou y col., 1999]. Por otro lado, existen datos conflictivos sobre la expresión de p27 y la susceptibilidad de las células a la apoptosis. Bajo condiciones de estrés o inflamación p27 contribuiría al arresto del ciclo celular que es esencial para la supervivencia [Sgambato y col., 2000]. Eymin y col. [1999] sugirieron que la sobre expresión de p27 en una línea humana de leucemia induciría resistencia a la apoptosis por varios agentes citotóxicos. Sgambato y col [2000] han reportado un paradójico aumento de la expresión de p27 en un grupo de carcinomas primarios de mama y colon. Este aumento también fue hallado en algunas líneas celulares mamarias altamente proliferativas (ZR25-1, MCF-7 y CAL51) [Fredersdorf y col., 1997]. Es posible que en estas líneas la sobre expresión de ciclina D/CDK4 o ciclina E/CDK2 pueda superar la inhibición de p27 y permitir la proliferación celular. Así, el balance entre dos señales opuestas, p27 y ciclinas/CDKs, tanto como el nivel absoluto de las señales individuales serían los determinantes del estado proliferativo [Fredersdorf y col., 1997]. Es interesante observar que en estas células de cáncer de mama con altos niveles de p27 se encontró inducción de la expresión de CDK4, sin embargo no hubo correlación con el nivel de CDK2 [Fredersdorf y col., 1997]. El incremento de p27 reflejaría la

existencia de un mecanismo regulatorio homeostático que protege a las células de potenciales efectos tóxicos, como el aumento de la expresión de ciclina E y D1 [Arber y col., 1997; Fredersdorf y col., 1997; Sgambato y col., 1997a] para limitar la proliferación descontrolada de las células tumorales [Sgambato y col., 1997b]. El aumento de la expresión de p27 en células de cáncer parece paradójica, ya que no se han encontrado mutaciones de este gen o son extremadamente raras en algunos tipos de tumores [Sgambato y col., 2000]. Una posible explicación para el aumento de p27 en algunas células de cánceres es que ellas se han vuelto refractarias a los efectos inhibitorios de esta proteína [Park y Lee, 2003].

El tratamiento con H_2O_2 en PC3 produjo un leve aumento de la proteína pro apoptótica Bax respecto al control y un gran incremento en la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-2, desplazando la tasa de Bcl-2/Bax a favor de la supervivencia. La inhibición de la actividad de caspasa-3 estuvo de acuerdo con este hecho. Mientras el conjunto de la fenomenología de la apoptosis dependiente de H_2O_2 está conservado, varios estudios reportaron variaciones específicas según el tipo celular en el comportamiento de las proteínas relacionadas con Bcl-2. Concomitantemente con la inhibición de la apoptosis, la sobre expresión de Bcl-XL y Bcl-2 indujo mutagénesis dependiente de H_2O_2 , implicando aumento de la supervivencia y escape de la muerte celular [Ryter y col., 2007].

La sumatoria de estos eventos confiere a las células PC3 de mecanismos que garantizan su viabilidad en condiciones de inducción de estrés oxidativo.

Cabe destacar que la diferencia en el perfil apoptótico en respuesta al estrés oxidativo en las líneas estudiadas, puede también provenir del estado de p53, teniendo en cuenta que las células LNCaP poseen p53 salvaje mientras que las células PC3 no poseen este gen.

Por lo tanto todos estos resultados muestran evidencias que bajo el tratamiento oxidativo las células sensibles e insensibles a andrógenos modulan en forma diferencial el control del ciclo celular, la distribución en las diferentes fases y la apoptosis.

Cuando las células LNCap expuestas a H_2O_2 fueron posteriormente tratadas con hemina no hubo modificaciones en la expresión de la ciclina D1, CDK4, p21 y p27 respecto al tratamiento con H_2O_2 . Sin embargo, se restauró el nivel de expresión de ciclina E y aumentó CDK2 respecto al tratamiento con H_2O_2 mostrando que se ha producido una alteración en la regulación del ciclo al no haber un aumento concomitante entre la expresión de la ciclina y su CDK asociada. El patrón de distribución en el ciclo celular no se modificó respecto al tratamiento oxidante. Por otro lado, observamos un gran incremento en la expresión de la proteína pro apoptótica Bax, mientras que la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-2 no se modificó, desplazando la tasa Bcl-2/Bax hacia la apoptosis y reforzando el perfil observado al tratar sólo con H_2O_2 . No se observaron cambios en la actividad de caspasa-3 sugiriendo que la apoptosis no se produciría a través de este camino.

En las células PC3, observamos que el tratamiento con hemina posterior al daño oxidativo inducido, produjo disminución en los niveles de la ciclina E, CDK2 y p27 y aumento de ciclina D1, respecto a las tratadas con H_2O_2 y no modificó significativamente la posición de las células en las distintas fases del ciclo celular, ya que se encontraron acumuladas en S y arrestadas en la fase G2/M al igual que las células tratadas únicamente con el oxidante. Estos hechos podrían asociarse con un acortamiento de la fase S, respecto a las tratadas sólo con H_2O_2 , permitiendo que algunas células re entren al ciclo celular luego del insulto oxidativo. También se observó un aumento en la tasa Bcl-2/Bax respecto al tratamiento con H_2O_2 y no hubo cambios en la de actividad de caspasa-3.

El tratamiento con hemina luego de inducir daño oxidativo reforzó sustancialmente el perfil de la expresión de los parámetros estudiados en las líneas sensible e insensible a andrógenos.

Abraham y col. [2003] reportaron que en células endoteliales el agregado de hemo por 24 hs no perturbaba la distribución del ciclo celular respecto a las células control.

En cuanto a las células LNCaP la exposición a hemina únicamente, provocó un aumento de ciclina E, disminución de p27 y no se modificó la distribución en las distintas fases del ciclo celular respecto al control. La expresión de la proteína Bax estuvo aumentada y Bcl-2 permaneció sin cambios por lo que tasa Bcl-2/Bax estuvo a favor de la apoptosis. En contraste la exposición de las células PC3 al mismo tratamiento, mostró un aumento de las ciclinas D1 y E, CDK4, p21 y p27. Las células no modificaron su distribución en el ciclo celular respecto al control. No se observó cambio en la expresión de la proteína Bax, Bcl-2 aumentó y así la tasa Bcl-2/Bax estuvo asociada con supervivencia. Esto estuvo de acuerdo con la inhibición de la actividad de caspasa-3.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con hemina no provocó cambios en la distribución celular en las células sensibles e insensibles a andrógenos, pero indujo apoptosis en la línea celular LNCaP y supervivencia en la línea PC3.

Otro aspecto a considerar, es la acción inhibitoria del proteasoma por efecto de la hemina [Grunberg-Etkovitz y col., 2006] siendo capaz de modificar la estabilidad de las proteínas. Las células que están en división activa parecen ser más susceptibles a la inhibición del proteasoma que las células quiescentes. Estudios recientes sugieren que los inhibidores del proteasoma sinergizan con agentes que dañan el ADN, al inhibir la transcripción de genes involucrados en la reparación del ADN dañado. La inhibición del proteasoma puede ser utilizada como una estrategia antitumoral ya que da lugar al cese del crecimiento (posiblemente mediado por p21 y p27) y al aumento de la apoptosis (a través de la acumulación de proteínas pro-apoptóticas como Bax).

A pesar de que un aumento en HO-1 se considera generalmente como un evento anti apoptótico, también en algunos casos se relacionó con apoptosis [Grojean y col., 2000; Panahian y Maines, 2001]. En células endoteliales pulmonares murinas sometidas a hiperoxia, el CO inhibió la activación de proteínas relacionadas con Bcl-2. Los autores demostraron por primera vez que la administración exógena de CO promovía la interacción entre HO-1 y Bax y especularon que esta asociación

bloquea la oligomerización de Bax, imposibilitando su capacidad para desestabilizar la membrana mitocondrial e iniciar la liberación del citocromo c. [Wang y col., 2007].

En nuestro modelo se comprobó que en las células PC3 la inducción de HO-1 coincidió con sobre expresión de Bcl-2 y la modulación de la maquinaria apoptótica por aumento de la proporción Bcl-2/Bax. La inducción de la expresión de HO-1 por H₂O₂ y/o hemina condujo a un aumento significativo en los niveles de la proteína anti apoptótica Bcl-2, mientras que el nivel de la proteína Bax se elevó levemente solo en las células previamente dañadas con H₂O₂. Lo inverso ocurrió con las células LNCaP, donde la sobre expresión exógena de HO-1 condujo a un marcado aumento de la proteína pro apoptótica Bax, mientras que Bcl-2 se mantuvo sin cambios. *La sobre expresión de HO-1 en las células LNCaP y PC3 provocada exógenamente luego de inducir daño oxidativo o por administración de hemina provocó efectos opuestos sobre el perfil de expresión de las proteínas involucradas en la maquinaria apoptótica.*

En resumen, consideramos que fue sumamente importante evaluar el nivel de expresión basal de la proteína de defensa antioxidante HO-1 y la respuesta al estrés oxidativo bajo tratamiento con un inductor específico en condiciones de sensibilidad e insensibilidad a andrógenos. Todos los hallazgos de esta tesis revelan la importancia de analizar no solo a la célula tumoral y su carga genética específica (sensibilidad o insensibilidad a andrógenos) sino también el microambiente que la rodea y su interrelación con el mismo. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer informe que documenta la translocación de la proteína en muestras de cánceres humanos y que la hemina induce este desplazamiento en líneas de PCa tanto sensibles como insensibles a andrógenos, desencadenando sin embargo una respuesta diferencial en el balance sobrevida/muerte. Estos resultados dejan abiertos nuevos interrogantes sobre el mecanismo de la translocación nuclear de HO-1 y su función en el núcleo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Mediante ensayos de inmunohistoquímica realizados en un número considerable de muestras de pacientes, el hallazgo más relevante de esta tesis ha sido la detección de la expresión nuclear de HO-1 asociada con la transformación maligna y probablemente relacionada con la progresión de la enfermedad. Esta localización define un sub grupo de pacientes con PCa primario. La translocación nuclear de HO-1 podría estar relacionada con funciones no descritas aún para esta proteína, que involucrarían la regulación de actividades de reparación del ADN o la expresión de factores de transcripción, promoviendo un fenotipo oncogénico diferente.

Además, se observó inmuno-reactividad citoplasmática positiva de HO-1 en tejido tumoral, parénquima no-neoplásico y BHP; esta localización estaría relacionada con su función citoprotectora y antioxidante.

La marcación nuclear de HO-1 podría ser utilizada como un probable marcador biológico del PCa. La identificación de los efectos benéficos o adversos de la expresión de HO-1 en un determinado cuadro clínico es de importancia para proveer nuevas alternativas en el control del componente oxidativo asociado al PCa, usando estrategias genéticas o farmacológicas.

Mediante estudios realizados *in vitro* demostramos que existe una expresión diferencial de HO-1 en las líneas de PCa, siendo la expresión basal en las células LNCaP superior que en las células PC3, probablemente relacionada con el mayor nivel de estrés oxidativo endógeno asociado a la sensibilidad a andrógenos o al aumento adaptativo a la tolerancia a dicho estrés desarrollado en las células más indiferenciadas.

En ambas líneas celulares fue posible modular la expresión de HO-1 mediante el tratamiento con hemina o SnPP.

La inducción de la expresión de HO-1 por la presencia de hemina en el medio de cultivo previno los efectos deletéreos del H₂O₂ en las células PC3, pero no ejerció un efecto citoprotector en las LNCaP.

Mediante análisis inmunocitológico y western blot de extractos citoplasmáticos y nucleares de las células LNCaP y PC3, comprobamos que la hemina induce translocación hacia el compartimiento nuclear de la proteína HO-1 independientemente de la sensibilidad a los andrógenos, probablemente relacionado con la regulación de la transcripción de genes que se expresan en respuesta a estrés.

En este trabajo también demostramos que bajo tratamiento oxidativo las células sensibles e insensibles a andrógenos modulan en forma diferencial el control del ciclo celular, la distribución en las diferentes fases y la apoptosis. El daño oxidativo en las células PC3 mediaría el desencadenamiento de una respuesta antiapoptótica que genera tolerancia a los agentes oxidantes en células sobrevivientes favoreciendo su recuperación y crecimiento, mientras que en las células LNCaP el mismo tratamiento indujo efectos opuestos. El tratamiento con hemina reforzó las respuestas al estrés oxidativo observadas en ambas líneas.

Estos resultados sugieren que HO-1 juega un rol en la señalización celular, en la regulación de la proliferación y el aumento de la defensa antioxidante. Por lo tanto, será necesario realizar estudios futuros para entender que efectos río abajo resultan de la translocación de HO-1 al núcleo y como este hecho media exactamente la citoprotección celular.

En conclusión, para establecer un estrategia terapéutica basada en la generación de ROS es sumamente importante evaluar el nivel de expresión basal de la proteína de defensa antioxidante HO-1, dado que el comportamiento celular como respuesta al estrés oxidativo es opuesto en condiciones de sensibilidad e insensibilidad a andrógenos.

Cabe resaltar la importancia de este estudio ya que se ha realizado tanto sobre muestras de pacientes con PCa y BHP como en líneas celulares humanas, teniendo en cuenta que la regulación de la expresión de HO-1 es diferente según el entorno celular.

Finalmente, esta tesis pretendió ser una contribución al conocimiento de los eventos moleculares asociados con el estrés oxidativo en el PCa y de esta manera

poder aumentar el desarrollo de biomarcadores que podrían resultar en mejores estrategias para la quimio prevención del PCa.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Aaltomaa S, Karja V, Lipponen P, Isotalo T, Kankkunen JP, Talja M, Mokka R (2006) Expression of Ki-67, cyclin D1 and apoptosis markers correlated with survival in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Anticancer Res* 26: 4873-4878.

Abate A, Zhao H, Wong RJ, Stevenson DK (2007) The role of Bach1 in the induction of heme oxygenase by tin mesoporphyrin. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 757-763.

Abate-Shen C, Shen MM (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14: 2410-2434.

Abate-Shen C, Shen MM (2005) An unusual gene dosage effect of p27kip1 in a mouse model of prostate cancer. *Cell Cycle* 4: e45-e47.

Abraham NG, Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Stoltz RA, Levere RD, Gerritsen ME, Shibahara S, Kappas A (1995) Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6798-6802.

Abraham NG, Scapagnini G, Kappas A (2003) Human heme oxygenase: cell cycle-dependent expression and DNA microarray identification of multiple gene responses after transduction of endothelial cells. *J Cell Biochem* 90: 1098-1111.

Abrahamsson PA, Cockett AT, di Sant' Agnese PA (1998) Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. *Prostate Suppl* 8: 37-42.

Alam J, Cai J, Smith A (1994) Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem* 269: 1001-1009.

Alam J, Cook JL (2007) How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 166-174.

Alam J, Igarashi K, Immenschuh S, Shibahara S, Tyrrell RM (2004) Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase. *Antioxid Redox Signal* 6: 924-933.

Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL (1999) Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274: 26071-26078.

Alam J, Wicks C, Stewart D, Gong P, Touchard C, Otterbein S, Choi AM, Burow ME, Tou J (2000) Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J Biol Chem* 275: 27694-27702.

- Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW (1999) Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 104: 1631-1639.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7915-7922.
- Anim JT, Udo C, John B (1998) Characterisation of inflammatory cells in benign prostatic hyperplasia. *Acta Histochem* 100: 439-449.
- Arber N, Doki Y, Han EK, Sgambato A, Zhou P, Kim NH, Delohery T, Klein MG, Holt PR, Weinstein IB (1997) Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res* 57: 1569-1574.
- Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS, Lambeth JD (2002) Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 715-720.
- Aydin A, Arsova-Sarafinovska Z, Sayal A, Eken A, Erdem O, Erten K, Ozgok Y, Dimovski A (2006) Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Biochem* 39: 176-179.
- Bagui TK, Mohapatra S, Haura E, Pledger WJ (2003) P27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes. *Mol Cell Biol* 23: 7285-7290.
- Bailar JC, III, Mellinger GT, Gleason DF (1966) Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage, and differentiation--preliminary report. *Cancer Chemother Rep* 50: 129-136.
- Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM (1992) Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267: 18148-18153.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH (2002) Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16093-16098.
- Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, Fernandez de MS, Glassford J, Medema RH, Mann DJ, Lam EW (2002) H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem* 277: 13761-13770.
- Bartek J, Lukas J (2001) Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13: 738-747.
- Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbinas A, Giese T, Giese N, Kunzli B, Autschbach F, Meuer S, Buchler MW, Friess H (2005) Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res* 11: 3790-3798.

- Bostwick DG (1996) Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer* 78: 330-336.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP (2002) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 277: 17950-17961.
- Brune B, Ullrich V (1987) Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 32: 497-504.
- Bui M, Reiter RE (1998) Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 17: 391-399.
- Busserolles J, Megias J, Terencio MC, Alcaraz MJ (2006) Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1510-1517.
- Caballero F, Meiss R, Gimenez A, Batlle A, Vazquez E (2004) Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in preneoplastic and neoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis. *Int J Exp Pathol* 85: 213-222.
- Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AM (1998) Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 226-234.
- Cardillo MR, Petrangeli E, Perracchio L, Salvatori L, Ravenna L, Di SF (2000) Transforming growth factor-beta expression in prostate neoplasia. *Anal Quant Cytol Histol* 22: 1-10.
- Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC, Nabulsi AA, Humerickhouse RA, Weinberg MA, Schmitt JL, Nelson JB (2003) Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 21: 679-689.
- Castronuovo CC, Sacca PA, Meiss R, Caballero FA, Batlle A, Vazquez ES (2006) Homeostatic response under carcinogen withdrawal, heme oxygenase 1 expression and cell cycle association. *BMC Cancer* 6: 286.
- Cermak J, Balla J, Jacob HS, Balla G, Enright H, Nath K, Vercellotti GM (1993) Tumor cell heme uptake induces ferritin synthesis resulting in altered oxidant sensitivity: possible role in chemotherapy efficacy. *Cancer Res* 53: 5308-5313.

Chang KW, Lee TC, Yeh WI, Chung MY, Liu CJ, Chi LY, Lin SC (2004) Polymorphism in heme oxygenase-1 (HO-1) promoter is related to the risk of oral squamous cell carcinoma occurring on male areca chewers. *Br J Cancer* 91: 1551-1555.

Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL (2004) Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10: 33-39.

Chen GG, Liu ZM, Vlantis AC, Tse GM, Leung BC, van Hasselt CA (2004) Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J Cell Biochem* 92: 1246-1256.

Chen QM, Liu J, Merrett JB (2000) Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem J* 347: 543-551.

Chen X, Ding YW, Yang G, Bondoc F, Lee MJ, Yang CS (2000) Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 21: 257-263.

Chen YR, Shrivastava A, Tan TH (2001) Down-regulation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase M3/6 and activation of JNK by hydrogen peroxide and pyrrolidine dithiocarbamate. *Oncogene* 20: 367-374.

Chernick RJ, Martasek P, Levere RD, Margreiter R, Abraham NG (1989) Sensitivity of human tissue heme oxygenase to a new synthetic metalloporphyrin. *Hepatology* 10: 365-369.

Choueiri MB, Tu SM, Yu-Lee LY, Lin SH (2006) The central role of osteoblasts in the metastasis of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25: 601-609.

Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM (1996) Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* 10: 1979-1990.

Cofey D (1994) ¿Qué es la próstata y cuál es su función? *Manual de Andrología de la Sociedad Americana de Andrología* (traducción) 21-24.

Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR, Rosenfeld RG (1993) Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1031-1035.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65: 10946-10951.

Converso DP, Taille C, Carreras MC, Jaitovich A, Poderoso JJ, Boczkowski J (2006) HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J* 20: 1236-1238.

Coqueret O (2003) New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 13: 65-70.

- Cordon-Cardo C (1995) Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 147: 545-560.
- Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodieci P, Osman I, Millard SS, Gaudin PB, Fazzari M, Zhang ZF, Massague J, Scher HI (1998) Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 90: 1284-1291.
- Cornell RB, Northwood IC (2000) Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization. *Trends Biochem Sci* 25: 441-447.
- Cosso L, Maineri EP, Traverso N, Rosatto N, Pronzato MA, Cottalasso D, Marinari UM, Odetti P (2001) Induction of heme oxygenase 1 in liver of spontaneously diabetic rats. *Free Radic Res* 34: 189-191.
- da Silva JL, Morishita T, Escalante B, Staudinger R, Drummond G, Goligorsky MS, Lutton JD, Abraham NG (1996) Dual role of heme oxygenase in epithelial cell injury: contrasting effects of short-term and long-term exposure to oxidant stress. *J Lab Clin Med* 128: 290-296.
- De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG (1999) Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 155: 1985-1992.
- De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, Isaacs WB, Nelson WG (2003) Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 62: 55-62.
- De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS (1998) Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol* 160: 2381-2392.
- Deftos LJ, Barken I, Burton DW, Hoffman RM, Geller J (2005) Direct evidence that PTHrP expression promotes prostate cancer progression in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 468-472.
- DePrimo SE, Diehn M, Nelson JB, Reiter RE, Matese J, Fero M, Tibshirani R, Brown PO, Brooks JD (2002) Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen. *Genome Biol* 3: 1-12.
- Deramaudt BM, Braunstein S, Remy P, Abraham NG (1998) Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 68: 121-127.
- Deramaudt BM, Remy P, Abraham NG (1999) Upregulation of human heme oxygenase gene expression by Ets-family proteins. *J Cell Biochem* 72: 311-321.
- Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Griending KK (2002) Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal* 4: 845-854.
- Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK (2005) Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-

mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J Biol Chem* 280: 16891-16900.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412: 822-826.

Doganavsargil B, Simsir A, Boyacioglu H, Cal C, Hekimgil M (2006) A comparison of p21 and p27 immunoexpression in benign glands, prostatic intraepithelial neoplasia and prostate adenocarcinoma. *BJU Int* 97: 644-648.

Dohi Y, Alam J, Yoshizumi M, Sun J, Igarashi K (2006) Heme oxygenase-1 gene enhancer manifests silencing activity in a chromatin environment prior to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: 60-67.

Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, Shibahara S, Ogawa M, Maeda H (1999) Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 80: 1945-1954.

Dong Z, Lavrovsky Y, Venkatachalam MA, Roy AK (2000) Heme oxygenase-1 in tissue pathology: the Yin and Yang. *Am J Pathol* 156: 1485-1488.

Drissi H, Hushka D, Aslam F, Nguyen Q, Buffone E, Koff A, van WA, Lian JB, Stein JL, Stein GS (1999) The cell cycle regulator p27kip1 contributes to growth and differentiation of osteoblasts. *Cancer Res* 59: 3705-3711.

Drobnjak M, Osman I, Scher HI, Fazzari M, Cordon-Cardo C (2000) Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clin Cancer Res* 6: 1891-1895.

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.

Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, Clinton WR, Lee ME, Nabel GJ, Nabel EG (2001) Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med* 7: 693-698.

Dulak J, Loboda A, Zagorska A, Jozkowicz A (2004) Complex role of heme oxygenase-1 in angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* 6: 858-866.

El Andaloussi A, Lesniak MS (2007) CD4(+)CD25 (+)FoxP3 (+) T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *J Neurooncol* in press.

Elbirt KK, Bonkovsky HL (1999) Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 438-447..

Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664-1672.

Elledge SJ, Harper JW (1998) The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1377: M61-M70.

- Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL (2005) The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29: 1228-1242.
- Erlandsson F, Wahlby C, Ekholm-Reed S, Hellstrom AC, Bengtsson E, Zetterberg A (2003) Abnormal expression pattern of cyclin E in tumour cells. *Int J Cancer* 104: 369-375.
- Ewing JF, Maines MD (2006) Regulation and expression of heme oxygenase enzymes in aged-rat brain: age related depression in HO-1 and HO-2 expression and altered stress-response. *J Neural Transm* 113: 439-454.
- Eymin B, Haugg M, Droin N, Sordet O, manche-Boitrel MT, Solary E (1999) p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogene* 18: 1411-1418.
- Fang J, Sawa T, Akaike T, Akuta T, Sahoo SK, Khaled G, Hamada A, Maeda H (2003) In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res* 63: 3567-3574.
- Feramisco JD, Goldstein JL, Brown MS (2004) Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis. *J Biol Chem* 279: 8487-8496.
- Fielder PJ, Rosenfeld RG, Graves HC, Grandbois K, Maack CA, Sawamura S, Ogawa Y, Sommer A, Cohen P (1994) Biochemical analysis of prostate specific antigen-proteolyzed insulin-like growth factor binding protein-3. *Growth Regul* 4: 164-172.
- Flad T, Mueller L, Dihazi H, Grigorova V, Bogumil R, Beck A, Thedieck C, Mueller GA, Kalbacher H, Mueller CA (2006) T cell epitope definition by differential mass spectrometry: identification of a novel, immunogenic HLA-B8 ligand directly from renal cancer tissue. *Proteomics* 6: 364-374.
- Fleshner N, Bagnell PS, Klotz L, Venkateswaran V (2004) Dietary fat and prostate cancer. *J Urol* 171: S19-S24.
- Fleshner NE, Klotz LH (1998) Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility. *Cancer Metastasis Rev* 17: 325-330.
- Foresti R, Motterlini R (1999) The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res* 31: 459-475.
- Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillett CE, Royds JA, Peston D, Hall PA, Hanby AM, Barnes DM, Shousha S, O'Hare MJ, Lu X (1997) High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6380-6385.
- Fu K, Sarras MP, Jr., De Lisle RC, Andrews GK (1997) Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol* 273: G696-G705.

- Galbraith R (1999) Heme oxygenase: who needs it?. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 299-305.
- Gann PH (2002) Risk factors for prostate cancer. *Rev Urol* 4 Suppl 5: S3-S10.
- Geisen C, Moroy T (2002) The oncogenic activity of cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein. *J Biol Chem* 277: 39909-39918.
- Gemsa D, Woo CH, Fudenberg HH, Schmid R (1974) Stimulation of heme oxygenase in macrophages and liver by endotoxin. *J Clin Invest* 53: 647-651.
- Gerstenbluth RE, Seftel AD, MacLennan GT, Rao RN, Corty EW, Ferguson K, Resnick MI (2002) Distribution of chronic prostatitis in radical prostatectomy specimens with up-regulation of bcl-2 in areas of inflammation. *J Urol* 167: 2267-2270.
- Geuken E, Buis CI, Visser DS, Blokzijl H, Moshage H, Nemes B, Leuvenink HG, de Jong KP, Peeters PM, Slooff MJ, Porte RJ (2005) Expression of heme oxygenase-1 in human livers before transplantation correlates with graft injury and function after transplantation. *Am J Transplant* 5: 1875-1885.
- Giono LE, Manfredi JJ (2006) The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol* 209: 13-20.
- Giordano A, Nisoli E, Tonello C, Canello R, Carruba MO, Cinti S (2000) Expression and distribution of heme oxygenase-1 and -2 in rat brown adipose tissue: the modulatory role of the noradrenergic system. *FEBS Lett* 487: 171-175.
- Giovannini C, Chieco P, Bertaccini A, Gramantieri L, Lacchini M, Martorana G (2004) Checkpoint effectors CDKN1A and Gadd45 correlate with oxidative DNA damage in human prostate carcinoma. *Anticancer Res* 24: 3955-3960.
- Gleason DF (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50: 125-128.
- Gonzales S, Erario MA, Tomaro ML (2002) Heme oxygenase-1 induction and dependent increase in ferritin. A protective antioxidant stratagem in hemin-treated rat brain. *Dev Neurosci* 24: 161-168.
- Gonzalez-Michaca L, Farrugia G, Croatt AJ, Alam J, Nath KA (2004) Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F370-F377.
- Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG (1997) Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 54-61.
- Greene FL., Page DL., Fleshner N (2002) *Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M (2000) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2175-2183.

- Grojean S, Koziel V, Vert P, Daval JL (2000) Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons. *Exp Neurol* 166: 334-341.
- Grönberg H (2003) Prostate cancer epidemiology. *The LANCET* 361: 859-864.
- Grover PL, Martin FL (2002) The initiation of breast and prostate cancer. *Carcinogenesis* 23: 1095-1102.
- Grunberg-Etkovitz N, Greenbaum L, Grinblat B, Malik Z (2006) Proteasomal degradation regulates expression of porphobilinogen deaminase (PBGD) mutants of acute intermittent porphyria. *Biochim Biophys Acta* 1762: 819-827.
- Guise TA, Yin JJ, Mohammad KS (2003) Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer* 97: 779-784.
- Guner G, Kirkali G, Yenisey C, Tore IR (1992) Cytosol and serum ferritin in breast carcinoma. *Cancer Lett* 67: 103-112.
- Gunther L, Berberat PO, Haga M, Brouard S, Smith RN, Soares MP, Bach FH, Tobiasch E (2002) Carbon monoxide protects pancreatic beta-cells from apoptosis and improves islet function/survival after transplantation. *Diabetes* 51: 994-999.
- Gurumurthy S, Vasudevan KM, Rangnekar VM (2001) Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 20: 225-243.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford
- Halvorsen OJ, Hostmark J, Haukaas S, Hoisaeter PA, Akslen LA (2000) Prognostic significance of p16 and CDK4 proteins in localized prostate carcinoma. *Cancer* 88: 416-424.
- Hamalainen E, Adlercreutz H, Puska P, Pietinen P (1984) Diet and serum sex hormones in healthy men. *J Steroid Biochem* 20: 459-464.
- Han EK, Sgambato A, Jiang W, Zhang YJ, Santella RM, Doki Y, Cacace AM, Schieren I, Weinstein IB (1995) Stable overexpression of cyclin D1 in a human mammary epithelial cell line prolongs the S-phase and inhibits growth. *Oncogene* 10: 953-961.
- Han X, Liehr JG, Bosland MC (1995) Induction of a DNA adduct detectable by 32P-postlabeling in the dorsolateral prostate of NBL/Cr rats treated with estradiol-17 beta and testosterone. *Carcinogenesis* 16: 951-954.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hancock WW (1998) Basic science aspects of chronic rejection: induction of protective genes to prevent development of transplant arteriosclerosis. *Transplant Proc* 30: 1585-1589.
- Hara E, Takahashi K, Tominaga T, Kumabe T, Kayama T, Suzuki H, Fujita H, Yoshimoto T, Shirato K, Shibahara S (1996) Expression of heme oxygenase and inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 153-158.

- Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634.
- Hasegawa Y, Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, Yoshida H, Kuma K, Amino N (2002) Decreased expression of glutathione peroxidase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma. *Cancer Lett* 182: 69-74.
- Hasegawa Y, Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, Yoshida H, Kuma K, Amino N (2003) Decreased expression of catalase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 33: 6-9.
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M (2004) Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336: 241-250.
- Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M (1999) Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 85: 663-671.
- Henderson BR, Percipalle P (1997) Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* 274: 693-707.
- Hill M, Pereira V, Chauveau C, Zagani R, Remy S, Tesson L, Mazal D, Ubillos L, Brion R, Asghar K, Mashreghi MF, Kotsch K, Moffett J, Doebis C, Seifert M, Boczkowski J, Osinaga E, Aneon I (2005) Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J* 19: 1957-1968.
- Hill RP (2006) Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 66: 1891-1895.
- Hill-Kapturczak N, Sikorski E, Voakes C, Garcia J, Nick HS, Agarwal A (2003) An internal enhancer regulates heme- and cadmium-mediated induction of human heme oxygenase-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F515-F523.
- Hill-Kapturczak N, Truong L, Thamilselvan V, Visner GA, Nick HS, Agarwal A (2000) Smad7-dependent regulation of heme oxygenase-1 by transforming growth factor-beta in human renal epithelial cells. *J Biol Chem* 275: 40904-40909.
- Hirai K, Sasahira T, Ohmori H, Fujii K, Kuniyasu H (2007) Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice. *Int J Cancer* 120: 500-505.
- Hori R, Kashiba M, Toma T, Yachie A, Goda N, Makino N, Soejima A, Nagasawa T, Nakabayashi K, Suematsu M (2002) Gene transfection of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 277: 10712-10718.

Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43: 1809-1818.

Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ (1998) Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* 53: 668-672.

Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271: 32253-32259.

Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J (2005) Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 58: 673-684.

Immenschuh S, Stritzke J, Iwahara S, Ramadori G (1999) Up-regulation of heme-binding protein 23 (HBP23) gene expression by lipopolysaccharide is mediated via a nitric oxide-dependent signaling pathway in rat Kupffer cells. *Hepatology* 30: 118-127.

Inguaggiato P, Gonzalez-Michaca L, Croatt AJ, Haggard JJ, Alam J, Nath KA (2001) Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney Int* 60: 2181-2191.

Jasani B, Schmid KW (1997) Significance of metallothionein overexpression in human tumours. *Histopathology* 31: 211-214.

Jazwa A, Loboda A, Golda S, Cisowski J, Szelag M, Zagorska A, Sroczynska P, Drukala J, Jozkowicz A, Dulak J (2006) Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 40: 1250-1263.

Jeggio PA, Loblrich M (2006) Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair* 5: 1192-1198.

Jozkowicz A, Huk I, Nigisch A, Weigel G, Weidinger F, Dulak J (2002) Effect of prostaglandin-J(2) on VEGF synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal* 4: 577-585.

Juang HH (2004) Modulation of iron on mitochondrial aconitase expression in human prostatic carcinoma cells. *Mol Cell Biochem* 265: 185-194.

Jung K, Seidel B, Rudolph B, Lein M, Cronauer MV, Henke W, Hampel G, Schnorr D, Loening SA (1997) Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells. *Free Radic Biol Med* 23: 127-133.

Kalinina EV, Chernov NN, Saprin AN, Kotova YN, Andreev YA, Solomka VS, Scherbak NP (2006) Changes in Expression of Genes Encoding Antioxidant Enzymes, Heme Oxygenase-1, Bcl-2, and Bcl-xl and in Level of Reactive Oxygen Species in Tumor Cells Resistant to Doxorubicin. *Biochemistry* 71: 1200-1206.

- Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Ross JS (1997) The prognostic significance of p34cdc2 and cyclin D1 protein expression in prostate adenocarcinoma. *Cancer* 80: 753-763.
- Kapturczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA, Agarwal A (2004) Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol* 165: 1045-1053.
- Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I (2002) Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* 33: 125-130.
- Kemp TJ, Causton HC, Clerk A (2003) Changes in gene expression induced by H₂O₂ in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 416-421.
- Keyse SM, Tyrrell RM (1989) Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 99-103.
- Kikuchi A, Yamaya M, Suzuki S, Yasuda H, Kubo H, Nakayama K, Handa M, Sasaki T, Shibahara S, Sekizawa K, Sasaki H (2005a) Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Hum Genet* 116: 354-360.
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M (2005b) Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 558-567.
- Kim HP, Ryter SW, Choi AM (2006) CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 411-449.
- Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AM (2004) Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 18: 1080-1089.
- Kirschenbaum A, Liu XH, Yao S, Narla G, Friedman SL, Martignetti JA, Levine AC (2006) Sex steroids have differential effects on growth and gene expression in primary human prostatic epithelial cell cultures derived from the peripheral versus transition zones. *Carcinogenesis* 27: 216-224.
- Kitamuro T, Takahashi K, Ogawa K, Uono-Fujimori R, Takeda K, Furuyama K, Nakayama M, Sun J, Fujita H, Hida W, Hattori T, Shirato K, Igarashi K, Shibahara S (2003) Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem* 278: 9125-9133.
- Klein EA, Casey G, Silverman R (2006) Genetic susceptibility and oxidative stress in prostate cancer: integrated model with implications for prevention. *Urology* 68: 1145-1151.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136.

- Kranenburg O, Scharnhorst V, Van der Eb AJ, Zantema A (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 131: 227-234.
- Kravets A, Hu Z, Miralem T, Torno MD, Maines MD (2004) Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 279: 19916-19923.
- Krishan A (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66: 188-193.
- Kronke G, Bochkov VN, Huber J, Gruber F, Bluml S, Furnkranz A, Kadl A, Binder BR, Leitinger N (2003) Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 278: 51006-51014.
- Kushida T, Quan S, Yang L, Ikehara S, Kappas A, Abraham NG (2002) A significant role for the heme oxygenase-1 gene in endothelial cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 68-75.
- Kutty RK, Nagineni CN, Kutty G, Hooks JJ, Chader GJ, Wiggert B (1994) Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 159: 371-378.
- Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW (2004) Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat Res* 555: 133-148.
- Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H (2006) Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem* 281: 33761-33772.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Landis-Piwowar KR, Milacic V, Chen D, Yang H, Zhao Y, Chan TH, Yan B, Dou QP (2006) The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. *Drug Resist Updat* 9: 263-273
- Laniado-Schwartzman M, Abraham NG, Connors M, Dunn MW, Levere RD, Kappas A (1997) Heme oxygenase induction with attenuation of experimentally induced corneal inflammation. *Biochem Pharmacol* 53: 1069-1075.
- Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Abraham NG (1993) Novel regulatory sites of the human heme oxygenase-1 promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 336-341.
- Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG (1994) Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5987-5991.

- Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B, Roy AK (2000) Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NFkappaB. *Mech Ageing Dev* 114: 49-60.
- Le Brun G., Aubin P, Soliman H, Ropiquet F, Villette JM, Berthon P, Creminon C, Cussenot O, Fiet J (1999) Upregulation of endothelin 1 and its precursor by IL-1beta, TNF-alpha, and TGF-beta in the PC3 human prostate cancer cell line. *Cytokine* 11: 157-162.
- Lee PJ, Alam J, Sylvester SL, Inamdar N, Otterbein L, Choi AM (1996) Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14: 556-568.
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 272: 5375-5381.
- Li B, Dou QP (2000) Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3850-3855.
- Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1566-1571.
- Li Volti G, Ientile R, Abraham NG, Vanella A, Cannavo G, Mazza F, Curro M, Raciti G, Avola R, Campisi A (2004) Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: effect of glutamate. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 517-524.
- Li Volti G., Wang J, Traganos F, Kappas A, Abraham NG (2002) Differential effect of heme oxygenase-1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1077-1082.
- Lim HW, Hong S, Jin W, Lim S, Kim SJ, Kang HJ, Park EH, Ahn K, Lim CJ (2005) Up-regulation of defense enzymes is responsible for low reactive oxygen species in malignant prostate cancer cells. *Exp Mol Med* 37: 497-506.
- Lim SD, Sun C, Lambeth JD, Marshall F, Amin M, Chung L, Petros JA, Arnold RS (2005) Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer. *Prostate* 62: 200-207.
- Lin CC, Chiang LL, Lin CH, Shih CH, Liao YT, Hsu MJ, Chen BC (2007) Transforming growth factor-beta1 stimulates heme oxygenase-1 expression via the PI3K/Akt and NF-kappaB pathways in human lung epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 560: 101-109.
- Lin Q, Weis S, Yang G, Weng YH, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gaunitz F, Dennery PA (2007). Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus

and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem* in press.

Liu AY, True LD, LaTray L, Nelson PS, Ellis WJ, Vessella RL, Lange PH, Hood L, van den EG (1997) Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10705-10710.

Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W (2002) Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 55: 396-405.

Liu ZM, Chen GG, Ng EK, Leung WK, Sung JJ, Chung SC (2004) Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells *Oncogene* 23: 503-513.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW (1999) p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154: 313-323.

Lo S, Di PS, Yusuf H, McCombe AW (2005) Constitutive (HO-2) and inducible (HO-1) haem oxygenase in pleomorphic adenomas of the human parotid: an immunocytochemical study. *J Laryngol Otol* 119: 179-183.

Logothetis CJ, Lin SH (2005) Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5: 21-28.

Lok CN, Loh TT (1998) Regulation of transferrin function and expression: review and update. *Biol Signals Recept* 7: 157-178.

Lu TH, Shan Y, Pepe J, Lambrecht RW, Bonkovsky HL (2000) Upstream regulatory elements in chick heme oxygenase-1 promoter: a study in primary cultures of chick embryo liver cells. *Mol Cell Biochem* 209: 17-27.

Macara IG (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 570-94.

Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M (2007) Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* in press.

Maines M.D. (1992) Heme Oxygenase: Clinical Applications and Functions. Boca Raton, CRC Press, 1-276.

Maines MD (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554.

Maines MD (2000) The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol* 46: 573-585.

Maines MD (2005a) New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiology* 20: 382-389.

Maines MD (2005b) The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid Redox Signal* 7: 1761-1766.

Maines MD, Abrahamsson PA (1996) Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* 47: 727-733.

Maines MD, Chung AS, Kutty RK (1982) The inhibition of testicular heme oxygenase activity by cadmium. A novel cellular response. *J Biol Chem* 257: 14116-14121.

Maines MD, Ewing JF, Huang TJ, Panahian N (2001) Nuclear localization of biliverdin reductase in the rat kidney: response to nephrotoxins that induce heme oxygenase-1. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 1091-1097.

Maines MD, Gibbs PE (2005) 30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 568-577.

Maines MD, Jollie DR (1984) Dissociation of heme metabolic activities from the microsomal cytochrome P-450 turnover in testis of hypophysectomized rats. *J Biol Chem* 259: 9557-9562.

Maines MD, Kappas A (1974) Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 4293-4297.

Maines MD, Kappas A (1977) Metals as regulators of heme metabolism. *Science* 198: 1215-1221.

Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 261: 411-419.

Malaguarnera L, Pilastro MR, Quan S, Ghattas MH, Yang L, Mezentsev AV, Kushida T, Abraham NG, Kappas A (2002) Significance of heme oxygenase in prolactin-mediated cell proliferation and angiogenesis in human endothelial cells. *Int J Mol Med* 10: 433-440.

Malins DC, Johnson PM, Wheeler TM, Barker EA, Polissar NL, Vinson MA (2001) Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer. *Cancer Res* 61: 6025-6028.

Malumbres M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 222-231.

Malumbres M, Hunt SL, Sotillo R, Martin J, Odajima J, Martin A, Dubus P, Ortega S, Barbacid M (2003) Driving the cell cycle to cancer. *Adv Exp Med Biol* 532: 1-11.

Marinissen MJ, Tanos T, Bolos M, de Sagarra MR, Coso OA, Cuadrado A (2006) Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 281: 11332-11346.

- Mark A, Hock T, Kapturczak MH, Agarwal A, Hill-Kapturczak N (2005) Induction of heme oxygenase-1 modulates the profibrotic effects of transforming growth factor-beta in human renal tubular epithelial cells. *Cell Mol Biol* 51: 357-362.
- Martinez ED, Danielsen M (2002) Loss of androgen receptor transcriptional activity at the G(1)/S transition. *J Biol Chem* 277: 29719-29729.
- Martinez-Muñoz C., Post JA, Verkleij AJ, Verrips CT, Boonstra J (2001) The effect of hydrogen peroxide on the cyclin D expression in fibroblasts. *Cell Mol Life Sci* 58: 990-996.
- Maruhashi K, Kasahara Y, Ohta K, Wada T, Ohta K, Nakamura N, Toma T, Koizumi S, Yachie A (2004) Paradoxical enhancement of oxidative cell injury by overexpression of heme oxygenase-1 in an anchorage-dependent cell ECV304. *J Cell Biochem* 93: 552-562.
- Mayer RD, Wang X, Maines MD (2003) Nitric oxide inhibitor N omega -nitro-L-arginine methyl ester potentiates induction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: a novel mechanism for regulation of the oxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 43-50.
- Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M, Marculescu R, Printz D, Fritsch G, Wagner O, Selzer E, Sperr WR, Valent P, Sillaber C (2004) Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 64: 3148-3154.
- Mazumder S, DuPree EL, Almasan A (2004) A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 4: 65-75.
- McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247: 725-732.
- McCoubrey WK, Jr., Maines MD (1994) The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene* 139: 155-161.
- McKenzie S, Kyprianou N (2006) Apoptosis evasion: the role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *J Cell Biochem* 97: 18-32.
- Minamino T, Christou H, Hsieh CM, Liu Y, Dhawan V, Abraham NG, Perrella MA, Mitsialis SA, Kourembanas S (2001) Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8798-8803.
- Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S (1995) Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1475-1479.

- Morris MJ, Scher HI (2003) Clinical approaches to osseous metastases in prostate cancer. *Oncologist* 8: 161-173.
- Morse D, Choi AM (2005) Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 660-670.
- Muppala V, Lin CS, Lee YH (2000) The role of HNF-1alpha in controlling hepatic catalase activity. *Mol Pharmacol* 57: 93-100.
- Navone NM, Labate ME, Troncoso P, Pisters LL, Conti CJ, von Eschenbach AC, Logothetis CJ (1999) p53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. *J Urol* 161: 304-308.
- Nelson PS, Clegg N, Arnold H, Ferguson C, Bonham M, White J, Hood L, Lin B (2002) The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11890-11895.
- Nie G, Chen G, Sheftel AD, Pantopoulos K, Ponka P (2006) In vivo tumor growth is inhibited by cytosolic iron deprivation caused by the expression of mitochondrial ferritin. *Blood* 108: 2428-2434.
- Nigg EA (1997) Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386: 779-787.
- Ning W, Song R, Li C, Park E, Mohsenin A, Choi AM, Choi ME (2002) TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L1094-L1102.
- Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T, Kuwano M (1999) Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 5: 1107-1113.
- Noel A, Tyrrell RM (1997) Development of refractoriness of induced human heme oxygenase-1 gene expression to reinduction by UVA irradiation and hemin. *Photochem Photobiol* 66: 456-463.
- Nowis D, Legat M, Grzela T, Niderla J, Wilczek E, Wilczynski GM, Glodkowska E, Mrowka P, Issat T, Dulak J, Jozkowicz A, Was H, Adamek M, Wrzosek A, Nazarewski S, Makowski M, Stoklosa T, Jakobisiak M, Golab J (2006) Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 25: 3365-3374.
- Oates PS, West AR (2006) Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol* 12: 4281-4295.
- Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H, Igarashi K (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* 20: 2835-2843.

- Oh HM, Kang YJ, Lee YS, Park MK, Kim SH, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC (2006) Protein kinase G-dependent heme oxygenase-1 induction by *Agastache rugosa* leaf extract protects RAW264.7 cells from hydrogen peroxide-induced injury. *J Ethnopharmacol* 103: 229-235.
- Ohno M, Fornerod M, Mattaj IW (1998) Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* 92: 327-336.
- Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T (2003) Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 417: 3-11.
- Okamoto I, Krogler J, Endler G, Kaufmann S, Mustafa S, Exner M, Mannhalter C, Wagner O, Pehamberger H (2006) A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with risk for melanoma. *Int J Cancer* 119: 1312-1315.
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao LH, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM (2000) Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6: 422-428.
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24: 449-455.
- Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, Chung HT (2004) Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 172: 4744-4751.
- Panahian N, Maines MD (2001) Site of injury-directed induction of heme oxygenase-1 and -2 in experimental spinal cord injury: differential functions in neuronal defense mechanisms? *J Neurochem* 76: 539-554.
- Parfenova H, Neff RA, III, Alonso JS, Shlopov BV, Jamal CN, Sarkisova SA, Leffler CW (2001) Cerebral vascular endothelial heme oxygenase: expression, localization, and activation by glutamate. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1954-C1963.
- Park MT, Lee SJ (2003) Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol* 36: 60-65.
- Pathak SK, Sharma RA, Steward WP, Mellon JK, Griffiths TR, Gescher AJ (2005) Oxidative stress and cyclooxygenase activity in prostate carcinogenesis: targets for chemopreventive strategies. *Eur J Cancer* 41: 61-70.
- Pepe P, Panella P, D'Arrigo L, Savoca F, Pennisi M, Aragona F (2006) Should men with serum prostate-specific antigen < or =4 ng/ml and normal digital rectal examination undergo a prostate biopsy? A literature review. *Oncology* 70: 81-89.
- Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM (2000) Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L312-L319.
- Petre-Draviam CE, Cook SL, Burd CJ, Marshall TW, Wetherill YB, Knudsen KE (2003) Specificity of cyclin D1 for androgen receptor regulation. *Cancer Res* 63: 4903-4913.

- Petre-Draviam CE, Williams EB, Burd CJ, Gladden A, Moghadam H, Meller J, Diehl JA, Knudsen KE (2005) A central domain of cyclin D1 mediates nuclear receptor corepressor activity. *Oncogene* 24: 431-444.
- Poss KD, Tonegawa S (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10919-10924.
- Poulos TL (2005) Structural biology of heme monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 337-345.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441: 437-443.
- Prawan A, Kundu JK, Surh YJ (2005) Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection. *Antioxid Redox Signal* 7: 1688-1703.
- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7: 1559-1571.
- Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL (2005) Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 41: 858-887.
- Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14: 1669-1679.
- Ribeiro FR, Diep CB, Jeronimo C, Henrique R, Lopes C, Eknaes M, Lingjaerde OC, Lothe RA, Teixeira MR (2006) Statistical dissection of genetic pathways involved in prostate carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 154-163.
- Ridnour LA, Oberley TD, Oberley LW (2004) Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. *Antioxid Redox Signal* 6: 501-512.
- Ripple MO, Henry WF, Rago RP, Wilding G (1997) Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89: 40-48.
- Rizzo S, Attard G, Hudson DL (2005) Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif* 38: 363-374.
- Rossi MC, Zetter BR (1992) Selective stimulation of prostatic carcinoma cell proliferation by transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6197-6201.
- Rostad K, Mannelqvist M, Halvorsen OJ, Oyan AM, Bo TH, Stordrange L, Olsen S, Haukaas SA, Lin B, Hood L, Jonassen I, Akslen LA, Kalland KH (2007) ERG upregulation and related ETS transcription factors in prostate cancer. *Int J Oncol* 30: 19-32.
- Rubin MA, De Marzo AM (2004) Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod Pathol* 17: 380-388.

- Rushworth SA, O'Connell MA (2004) Haem oxygenase-1 in inflammation. *Biochem Soc Trans* 32: 1093-1094.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM (2007) Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 9: 49-89.
- Ryter SW, Morse D, Choi AM (2004) Carbon monoxide: to boldly go where NO has gone before. *Sci STKE* 2004: 6-10.
- Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM (2002) Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235: 249-263.
- Sacca P, Caballero F, Batlle A, Vazquez E (2004) Cell cycle arrest and modulation of HO-1 expression induced by acetyl salicylic acid in hepatocarcinogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1945-1953.
- Salim M, Brown-Kipphut BA, Maines MD (2001) Human biliverdin reductase is autophosphorylated, and phosphorylation is required for bilirubin formation. *J Biol Chem* 276: 10929-10934.
- Sampson N, Untergasser G, Plas E, Berger P (2007) The ageing male reproductive tract. *J Pathol* 211: 206-218.
- Sardana MK, Kappas A (1987) Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2464-2468.
- Sasaki T, Yoshida K, Kondo H, Ohmori H, Kuniyasu H (2005) Heme oxygenase-1 accelerates protumoral effects of nitric oxide in cancer cells. *Virchows Arch* 446: 525-531.
- Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* 432: 294-297.
- Schacter BA, Kurz P (1986) Alterations in microsomal drug metabolism and heme oxygenase activity in isolated hepatic parenchymal and sinusoidal cells in Murphy-Sturm lymphosarcoma-bearing rats. *Clin Invest Med* 9: 150-155.
- Schalken JA, van LG (2003) Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology* 62: 11-20.
- Schulz WA, Hatina J (2006) Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med* 10: 100-125.
- Schwartz GK, Shah MA (2005) Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 23: 9408-9421.
- Segui-Simarro JM, Testillano PS, Risueno MC (2003) Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *J Struct Biol* 142: 379-391.
- Senderowicz AM (2002) Cyclin-dependent kinases as new targets for the prevention and treatment of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 16: 1229-1253.

- Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB (2000) Multiple functions of p27(Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol* 183: 18-27.
- Sgambato A, Doki Y, Schieren I, Weinstein IB (1997a) Effects of cyclin E overexpression on cell growth and response to transforming growth factor beta depend on cell context and p27Kip1 expression. *Cell Growth Differ* 8: 393-405.
- Sgambato A, Zhang YJ, Arber N, Hibshoosh H, Doki Y, Ciaparrone M, Santella RM, Cittadini A, Weinstein IB (1997b) Deregulated expression of p27(Kip1) in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 3: 1879-1887.
- Shah US, Getzenberg RH (2004) Fingerprinting the diseased prostate: associations between BPH and prostate cancer. *J Cell Biochem* 91: 161-169.
- Sheftel AD, Kim SF, Ponka P (2007) Non-heme induction of heme oxygenase-1 does not alter cellular iron metabolism. *J Biol Chem* in press.
- Shi W, Haberland ME, Jien ML, Shih DM, Lusis AJ (2000) Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation* 102: 75-81.
- Shibahara S, Muller R, Taguchi H, Yoshida T (1985) Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7865-7869.
- Shibahara S, Muller RM, Taguchi H (1987) Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262: 12889-12892.
- Shibahara S, Nakayama M, Kitamuro T, Udono-Fujimori R, Takahashi K (2003) Repression of heme oxygenase-1 expression as a defense strategy in humans. *Exp Biol Med* 228: 472-473.
- Shibahara S, Sato M, Muller RM, Yoshida T (1989) Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur J Biochem* 179: 557-563.
- Siow RC, Sato H, Mann GE (1999) Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide?. *Cardiovasc Res* 41: 385-394.
- Slebos DJ, Ryter SW, van der TM, Liu F, Guo F, Baty CJ, Karlsson JM, Watkins SC, Kim HP, Wang X, Lee JS, Postma DS, Kauffman HF, Choi AM (2006) Mitochondrial Localization and Function of Heme Oxygenase-1 in Cigarette Smoke-Induced Cell Death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:409-417.
- Smith MA, Kutty RK, Richey PL, Yan SD, Stern D, Chader GJ, Wiggert B, Petersen RB, Perry G (1994) Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 145: 42-47.
- Sobin LH, Wittekind C (2002) UICC TNM Classification of Malignant Tumours. 6th ed. Wiley-LissNew York.
- Song R, Mahidhara RS, Liu F, Ning W, Otterbein LE, Choi AM (2002) Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 603-610.

St Croix B., Florenes VA, Rak JW, Flanagan M, Bhattacharya N, Slingerland JM, Kerbel RS (1996) Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 2: 1204-1210.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-1046.

Sugimura T (1992) Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science* 258: 603-607.

Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M, Igarashi K (2002) Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 21: 5216-5224.

Sun XY, Donald SP, Phang JM (2001) Testosterone and prostate specific antigen stimulate generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 22: 1775-1780.

Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, Lozonschi L, Motoi F, Yamauchi J, Matsuno S, Shibahara S, Abraham NG (2003) Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 6: 15-24.

Suttner DM, Dennery PA (1999) Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 13: 1800-1809.

Suttner DM, Sridhar K, Lee CS, Tomura T, Hansen TN, Dennery PA (1999) Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells. *Am J Physiol* 276: L443-L451.

Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, Ikeda-Saito M, Yoshida M, Igarashi K (2004) Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J* 23: 2544-2553.

Suzuki H, Tashiro S, Sun J, Doi H, Satomi S, Igarashi K (2003) Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 278: 49246-49253.

Suzuki Y, Kondo Y, Himeno S, Nemoto K, Akimoto M, Imura N (2000) Role of antioxidant systems in human androgen-independent prostate cancer cells. *Prostate* 43: 144-149.

Takahashi K, Hara E, Suzuki H, Sasano H, Shibahara S (1996) Expression of heme oxygenase isozyme mRNAs in the human brain and induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide donors. *J Neurochem* 67: 482-489.

Takeda K, Ishizawa S, Sato M, Yoshida T, Shibahara S (1994) Identification of a cis-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene. *J Biol Chem* 269: 22858-22867.

Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y, Maeda H (2003) Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 88: 902-909.

- Tansey WP (2004) Death, destruction, and the proteasome. *N Engl J Med* 351: 393-394.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61: 748-755.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 244: 6388-6394.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R (1970) The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 75: 410-421.
- Tian J, Zheng Y, Yang C (2004) Effect of sex hormones on heme oxygenase expression in rat ventral prostate. *Acta Physiol Sinica* 56: 54-59.
- Tokar EJ, Ancrile BB, Cunha GR, Webber MM (2005) Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer. *Differentiation* 73: 463-473.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310: 644-648.
- Toritsu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M (2000) Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res* 91: 906-910.
- Toth B, Yokoyama Y, Kuebler JF, Schwacha MG, Rue LW, III, Bland KI, Chaudry IH (2003) Sex differences in hepatic heme oxygenase expression and activity following trauma and hemorrhagic shock. *Arch Surg* 138: 1375-1382.
- Toyokuni S (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 49: 91-102.
- Toyokuni S (2004) Redox control of carcinogenesis and tumor biology. *Antioxid Redox Signal* 6: 481-482.
- Toyokuni S (2006) Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 8: 1373-1377.
- Tozer GM, Prise VE, Motterlini R, Poole BA, Wilson J, Chaplin DJ (1998) The comparative effects of the NOS inhibitor, Nomega-nitro-L-arginine, and the haemoxygenase inhibitor, zinc protoporphyrin IX, on tumour blood flow. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 849-853.
- Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD (1986) Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J Biol Chem* 261: 11131-11137.
- Trakshel GM, Maines MD (1989) Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. *J Biol Chem* 264: 1323-1328.

- Tsuchihashi S, Livhits M, Zhai Y, Busuttill RW, Araujo JA, Kupiec-Weglinski JW (2006) Basal rather than induced heme oxygenase-1 levels are crucial in the antioxidant cytoprotection. *J Immunol* 177: 4749-4757.
- Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, Toyooka H, Yoshida H (1999) Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 138: 53-59.
- Turley RS, Finger EC, Hempel N, How T, Fields TA, Blobe GC (2007) The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Res* 67: 1090-1098.
- van Leenders GJ, Gage WR, Hicks JL, van BB, Aalders TW, Schalken JA, De Marzo AM (2003) Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol* 162: 1529-1537.
- van Leenders GJ, Schalken JA (2001) Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. *BJU Int* 88 Suppl 2: 35-42.
- Venkataraman S, Wagner BA, Jiang X, Wang HP, Schafer FQ, Ritchie JM, Patrick BC, Oberley LW, Buettner GR (2004) Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes the survival of prostate cancer cells exposed to hyperthermia. *Free Radic Res* 38: 1119-1132.
- Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259: 381-384.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36: 131-149.
- Vile GF, Tyrrell RM (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 268: 14678-14681.
- Vogelstein B, Kinzler, KW (1998) The genetic basis of human cancer. Mc. Graw-Hill, New York.
- Von Burg R (1999) Carbon monoxide. *J Appl Toxicol* 19: 379-386.
- von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N (2000) Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 28: 64-74.
- Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ (2003) The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 9: 6316-6325.
- Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 55: 551-571.
- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979) Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17: 159-163.

- Wang X, Hauptmann N, Taylor E, Foreman M, Khawli LA, Maines MD (2003) Neotrofin increases heme oxygenase-1 selectively in neurons. *Brain Res* 962: 1-14.
- Wang X, Wang Y, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM (2007) Carbon Monoxide Protects against Hyperoxia-induced Endothelial Cell Apoptosis by Inhibiting Reactive Oxygen Species Formation. *J Biol Chem* 282: 1718-1726.
- Was H, Cichon T, Smolarczyk R, Rudnicka D, Stopa M, Chevalier C, Leger JJ, Lackowska B, Grochot A, Bojkowska K, Ratajska A, Kieda C, Szala S, Dulak J, Jozkowicz A (2006) Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am J Pathol* 169: 2181-2198.
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330.
- Wicha MS, Liu S, Dontu G (2006) Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. *Cancer Res* 66: 1883-1890.
- Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA (1996) Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2: 87-90.
- Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N (2001) Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Res* 61: 1227-1232.
- Wu WT, Chi KH, Ho FM, Tsao WC, Lin WW (2004) Proteasome inhibitors up-regulate haem oxygenase-1 gene expression: requirement of p38 MAPK activation but not of NF-kappaB inhibition. *Biochem J* 379: 587-593.
- Xie K, Huang S (2003) Regulation of cancer metastasis by stress pathways. *Clin Exp Metastasis* 20: 31-43.
- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S (1999) Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103: 129-135.
- Yamamoto A, Hashimoto Y, Kohri K, Ogata E, Kato S, Ikeda K, Nakanishi M (2000) Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J Cell Biol* 150: 873-880.
- Yamanaka N, Deamer D (1974) Superoxide dismutase activity in WI-38 cell cultures: effects of age, trypsinization and SV-40 transformation. *Physiol Chem Phys* 6: 95-106.
- Yanagawa T, Omura K, Harada H, Nakaso K, Iwasa S, Koyama Y, Onizawa K, Yusa H, Yoshida H (2004) Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 40: 21-27.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132.
- Yilmaz MI, Saglam K, Sonmez A, Gok DE, Basal S, Kilic S, Akay C, Kocar IH (2004) Antioxidant system activation in prostate cancer. *Biol Trace Elem Res* 98: 13-19.

- Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF- κ B (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 20: 6755-6767.
- Yoshida T, Ishikawa K, Sato M (1991) Degradation of heme by a soluble peptide of heme oxygenase obtained from rat liver microsomes by mild trypsinization. *Eur J Biochem* 199: 729-733.
- Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A (1982) The occurrence of molecular interactions among NADPH-cytochrome c reductase, heme oxygenase, and biliverdin reductase in heme degradation. *J Biol Chem* 257: 7786-7793.
- Zeng L, Kyprianou N (2005) Apoptotic regulators in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): value in prostate cancer detection and prevention. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8: 7-13.
- Zhang F, Kaide JI, Rodriguez-Mulero F, Abraham NG, Nasjletti A (2001) Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. *Am J Hypertens* 14: 625-675.
- Zhang X, Shan P, Otterbein LE, Alam J, Flavell RA, Davis RJ, Choi AM, Lee PJ (2003) Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem* 278: 1248-1258.
- Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T (1999) Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 18: 1131-1138.
- Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439.
- Zhou P, Yao Y, Soh JW, Weinstein IB (1999) Overexpression of p21Cip1 or p27Kip1 in the promyelocytic leukemia cell line HL60 accelerates its lineage-specific differentiation. *Anticancer Res* 19: 4935-4945.
- Zhu B, Kyprianou N (2005) Transforming growth factor beta and prostate cancer. *Cancer Treat Res* 126: 157-173.
- Zinkel S, Gross A, Yang E (2006) BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 13: 1351-1359.
- Zwerina J, Tzima S, Hayer S, Redlich K, Hoffmann O, Hanslik-Schnabel B, Smolen JS, Kollias G, Schett G (2005) Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J* 19: 2011-2013.