

Tesis Doctoral

Nuevos blancos moleculares en el cáncer de próstata

Moiola, Cristian Pablo

2012

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:

Moiola, Cristian Pablo. (2012). Nuevos blancos moleculares en el cáncer de próstata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Moiola, Cristian Pablo. "Nuevos blancos moleculares en el cáncer de próstata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

“Nuevos blancos moleculares en el cáncer de próstata”

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

Lic. Cristian Pablo Moiola

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

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

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

IQUIBICEN - CONICET

Buenos Aires, 2012

RESUMEN

NUEVOS BLANCOS MOLECULARES EN EL CANCER DE PROSTATA

El cáncer de próstata (PCa) es el segundo tipo de cáncer más frecuente en el mundo. En la Argentina, es el de mayor incidencia y el segundo en mortalidad. La edad, el origen étnico, la historia familiar, el estilo de vida y la obesidad son importantes factores de riesgo asociados al desarrollo de esta patología.

En este trabajo de tesis nos centralizamos en el rol de BRCA1 en diferentes vías que contribuyen al desarrollo del PCa. Estudiamos la regulación transcripcional mediada por BRCA1 del gen ATM, clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica celular. Determinamos que el complejo formado por las proteínas BRCA1, E2F1 y CtIP, se asocian al promotor de ATM y activan su transcripción. Asimismo, cuando se induce estrés genotóxico, BRCA1 y CtIP se liberan reprimiendo su transcripción.

Además, estudiamos la regulación transcripcional de BRCA1. Encontramos que los andrógenos, la principal hormona masculina, regula la expresión de BRCA1 en líneas celulares de PCa. Esta hormona reprime la transcripción de BRCA1 en las células LNCaP, sensibles a andrógenos. Mientras que en las células PC3, insensibles a andrógenos, la testosterona aumenta los niveles de expresión de BRCA1. Esta diferencia en la respuesta a la testosterona en las células tumorales de próstata parece responder a un efecto en la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos.

En este trabajo de tesis también determinamos que las proteínas CtBP1 y BRCA1 se encuentran asociadas a la región proximal del promotor de BRCA1 reprimiendo su transcripción. En la línea tumoral PC3, la testosterona provoca que estos factores se liberen del promotor de BRCA1 activando su transcripción.

Utilizando líneas celulares que sobre-expresan o tienen disminuida en forma estable la expresión de CtBP1, encontramos que la sobreexpresión de CtBP1 aumenta la transformación y la viabilidad celular. En un modelo de xenotransplantes generado por inoculación de estas células estables en ratones nude, determinamos que la disminución de la expresión de CtBP1 disminuyó drásticamente el crecimiento tumoral solo cuando los animales habían sido alimentados con una dieta hipercalórica. Asimismo, la incubación de las líneas estables de PC3 con el suero proveniente de animales alimentados con una dieta hipercalórica aumento la proliferación celular de las células que sobre-expresan CtBP1 al igual que se ven favorecidos la activación de procesos de EMT que podrían conducir al establecimiento de metástasis.

En resumen, en este trabajo de tesis describimos por primera vez un mecanismo de regulación transcripcional de ATM por BRCA1 en respuesta al estrés genotóxico. Además determinamos que los andrógenos y la dieta hipercalórica pueden influenciar el desarrollo tumoral prostático alterando la vía de CtBP1/BRCA1. Por lo tanto, estos resultados aportan nuevas evidencias en cuanto a la regulación transcripcional de BRCA1 y su función co-reguladora de otros blancos moleculares fortaleciendo así su rol supresor tumoral en el PCa.

Palabras claves: CANCER DE PROSTATA; BRCA1; TRANSCRIPCIÓN; DAÑO EN EL ADN.

ABSTRACT**NEW MOLECULAR TARGETS IN PROSTATE CANCER**

Prostate cancer (PCa) is the second most frequently diagnosed cancer in the world. In Argentina, has the highest incidence rate and is the second leading cause of deaths in males. Several factors, such as ethnicity, age, family history, lifestyle and obesity, have been associated with and increase risk of developing this pathology.

In this thesis we focus on BRCA1's role in different molecular pathways that contribute to the development of PCa. We studied ATM transcriptional regulation mediated by BRCA1 and its importance in the maintenance of cellular genomic stability. We determined that the molecular complex formed by BRCA1, CtIP and E2F1 proteins are associated with ATM promoter and activate its transcription. In addition, CtIP and BRCA1 are release and repressed ATM promoter under genotoxic stress conditions.

On the other hand, we studied BRCA1 transcriptional regulation. We found that androgens regulate BRCA1 expression in PCa cell lines. Particularly, testosterone represses BRCA1 transcription in androgens sensitive LNCaP cells. However, testosterone increases BRCA1 expression levels in PC3 insensitive to androgens cell lines. This contradictory behavior in PCa cell lines may be due to an effect on the synthesis of estrogens from androgens.

Moreover, we found that CtBP1 and BRCA1 proteins are associated to BRCA1 proximal promoter to repress its transcription. However, in PC3 cell lines, testosterone induces BRCA1 transcription causing the release of these factors. Furthermore, we generated PC3 cell lines with stable overexpression or knockdown CtBP1 expression. We found that CtBP1 overexpression enhanced cellular transformation and increased cell viability. We also determined, in a xenograft nude mice model generated by PC3 stable cell lines inoculation, that the decreased expression of CtBP1 drastically diminished the tumor growth only when the animals had been high-calorie diet fed. In addition, incubation of stable lines PC3 with serum from animals fed with a hypercaloric diet, increased cell proliferation of cells that overexpress CtBP1. Finally CtBP1 overexpressing cells have enhanced EMT activation toward CtBP1 silencing cell lines leading to the establishment of metastasis.

In summary, we describe for the first time a transcriptional regulation mechanism of ATM by BRCA1 in response to genotoxic stress. We also determined that androgens and high caloric diet modulate CtBP1/BRCA1 pathway affecting prostate tumor development. Therefore, these results provide further evidence of BRCA1 transcriptional regulation and BRCA1 transcriptional co-regulatory function, strengthening its tumor suppressor role in PCa.

Key words: BRCA1; PROSTATE CANCER; TRANSCRIPTION; DNA DAMAGE.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado a continuación puede ser tomado meramente como el resultado de una investigación desarrollada en un periodo de tiempo dado, aportando nuevos conocimientos sobre un tema en particular, con sus aciertos y falencias; pero definitivamente, esas páginas no serán capaces de retratar, el esfuerzo, dedicación y constancia que fue necesario para llevarlo adelante, y mucho menos el apoyo y colaboración de muchas personas que hicieron posible que hoy, el resultado de tanto trabajo, pueda ver la luz. Las siguientes líneas, son un pequeño reconocimiento para el inmenso aporte que cada uno de ustedes me brindó a lo largo de este camino.

En primer lugar quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, que me brindó educación con docentes y científicos de excelencia. Asimismo, agradecer a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al CONICET quienes fueron los responsables de financiar este proyecto.

Sin lugar a dudas, la principal responsable para que este trabajo se haya desarrollado y llegado hasta este punto; lejos está el final todavía!, es mi directora de tesis, la Dra. Adriana De Siervi. Te agradezco enormemente porque en todo momento estuviste presente, proponiendo ideas y escuchando las mías, siempre con ánimo para seguir adelante y confiando en mí. La Dra. Elba Vazquez, merece un párrafo aparte. Se merece el mayor de mi respeto, mostrándonos día a día el amor por la ciencia y toda su dedicación y pasión por su trabajo; un ejemplo a seguir. Les estoy sumamente agradecido a ambas por abrirme la puerta al labo y guiarme durante esta etapa de formación profesional.

A pesar de todo el esfuerzo y empeño que puse por este trabajo, sinceramente creo que jamás hubiera sido posible culminarlo sin la ayuda y colaboración de todo un grupo de trabajo que acompañe las ideas. Afortunadamente estoy en condiciones de decir que mis compañeros han dado muestra sobrada en lo que respecta a solidaridad y colaboración con sus pares. Estoy muy contento y orgulloso de haber formado parte de un grupo de trabajo formidable, desde lo laboral hasta lo personal. Quiero expresar mi agradecimiento a cada uno de los integrantes de nuestro labo, Javier, Geraldine, Paola, Flor, Belén, Mechi, Daia, Felipe, Tefi, Alejandra y a los que pasaron por aquí y también dejaron su impronta, Angie y Alejandro. Todos y cada uno, desde su lugar han sido muy importantes para mí, para que todos los días haga mi trabajo de la mejor manera, en un ambiente cálido y amigable. A todos les agradezco profundamente por

cada momento que me brindaron ya sea para discutir resultados o planear experimentos así como también para charlar “de la vida misma” y distraernos un poco.

No obstante, si se me permite abrir un paréntesis aquí, quisiera agradecer de manera muy especial, a Paola y a Flor, no sólo por ser parte del BRCA team, y tirar para el mismo lado siempre, dejando de lado en ocasiones sus tareas para extenderme una mano cuando la necesite; sino porque además son excelentes personas, con un corazón inmenso. Me da mucho gusto haber compartido todos los días con uds. También quiero agradecer a Mechi y Belén, a mis “compañeras de año”, que vivieron tan intensamente como yo este último año pero siempre aportando alegría, y dispuestas a colaborar en lo que fuera necesario. ¡Las voy a extrañar; muchos éxitos!

Asimismo, muchos de los resultados obtenidos no se hubiesen conseguido si no fuera por la colaboración de un sinnúmero de investigadores que desinteresadamente dieron parte de su tiempo o prestaron reactivos para que mi trabajo continúe avanzando. En este sentido quiero agradecer a los doctores Omar Pignataro, Martin Monte, Eduardo Cánepa, Omar Cosso, Adali Pecci, Edith Kordon, Alejandra Guberman, Susana Correa, Mariana Bermúdez, Mónica Kotler, Anabella Srebrow, Roberto Meiss, Daniel Compagno, Diego Laderach, Marcelo Perrone, Federico Coluccio, y a los integrantes de sus respectivos grupos de investigación. En especial me gustaría mencionar a Fernanda y Fátima; a Daiana y Julián; Johi, Vicky, Andrés, Dieguito, Diego, Pao, Nadia y Martin; a Clau, Noe y Ari; Sabri, el Chino, Cris y Marcos; Agustina y Roxi; Mariano, Petry; Lucas; Andrés; Martin, Lucía, Jimena, Federico; a los chicos de Química Orgánica, Mariano y Gabriel; y seguramente a muchos más que de una u otra forma colaboraron con la realización de este trabajo.

Más allá de todo y la cantidad de gente involucrada para llevar adelante este trabajo, quiero reconocer a quienes desde el plano emocional, estuvieron presentes para que pueda continuar con mi carrera y mi trabajo aún en las adversidades. En este sentido, el primer premio lo llevan mis papas. Mamá, Papá, muchísimas gracias por seguir acompañándome, estar presentes en todo momento, y compartir mis momentos de felicidad y también de tristezas. Los quiero mucho!. También agradecer a mis hermanos, Mauri y Mati, con los cuales compartí gran parte de este camino, creciendo junto a ellos. Gracias por acompañarme y ayudarme cada vez que los necesite.

También muy agradecido a toda mi familia, entendiéndose por ello a tios/as, primos/as ... etc, son un número desorbitante. Sin embargo, desde muy cerca o a distancia, siempre sentí el apoyo de cada uno de ustedes. En especial quiero

mencionar y agradecer a Mirta, Ana María, Cris, Pao y Gabriel, Sergio y Norma, a Rubén, Jorge, Norman, Beto, Ñata, Pirucha, Alicia, Rulo y a la memoria de Ana y Pedro. Mi familia es y siempre será un espejo donde mirarme y el punto de partida para cada camino que tome.

Una parte importante de mi vida la integran mis amigos. Con ellos compartí y seguiré compartiendo muchas emociones y “aventuras”. Y a pesar de que nos vamos poniendo viejos y cada uno empieza a transitar su propio destino, estoy convencido que el vínculo forjado durará eternamente. A ellos, que comprenden mejor que nadie lo que es atravesar esta etapa de nuestras vidas quiero dedicarles estas líneas de agradecimiento. Sin ustedes, muy difícilmente hubiese podido hacer siquiera una fracción de lo que hasta hoy conseguí; con ustedes puedo hacer mucho más!. Me gustaría nombrarlos a todos aunque inevitablemente siempre faltará alguno. Gracias Charly, Toti, Rafa, Nico, Guille, Peter, Marcos, Manu, Fer, Marto, Mechi, Agos, Ceci, Chechu, Ali, Cami, Yas, Esteban, Belén, Rasco, José, Ale, Facu D, Facu M, Andy, Eze. También recordar a la banda de Pehuajó, Aldo, Mane, Juan, Nico, Martin, Tintino, JM, Euge... y la lista continua y espero siga creciendo.

Este último párrafo está dedicado a Candy, porque este tiempo juntos ha sido maravilloso. Sos mi cable a tierra, ayudándome a redimensionar y poner en perspectiva cada momento, dándome paz cada instante que lo necesite, siempre a mi lado. Muchísimas gracias por compartir todo esto conmigo, te quiero mucho.

Finalmente quiero expresar un último deseo; que el granito de arena que cada uno de ustedes depositó en mí y en este trabajo, de sus frutos y en un futuro que estos resultados contribuyan para el bienestar de nuestra sociedad.

Mis más sinceras y sentidas palabras de agradecimiento para todos.

MUCHAS GRACIAS!

**A mis padres, hermanos,
y a toda mi familia.**

ÍNDICE

PUBLICACIONES	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN.....	6
CAPÍTULO I. El cáncer de próstata.....	7
1.1. La próstata: aspectos generales.....	8
1.2. Patologías asociadas a la próstata	9
1.3. Aspectos generales del cáncer.....	11
1.4. Incidencia del cáncer en la población	13
1.5. Incidencia del cáncer de próstata en la población.....	13
1.6. Características y etapas del PCa.....	14
1.7. Diagnóstico del PCa	17
1.8. Alteraciones genéticas asociadas al PCa	17
1.8.1. Re-arreglos cromosómicos	18
1.8.2. Inactivación de genes supresores tumorales	19
1.8.3. Activación de oncogenes	20
1.8.4. Alteraciones en el receptor de andrógenos	21
1.9. Etiología del PCa.....	22
1.9.1. Factores constitucionales o endógenos	23
1.9.2. Factores exógenos	24
CAPÍTULO II. Rol de BRCA1 y otras proteínas relacionadas en la inestabilidad.....	28
genómica en la etiología del PCa.....	28
2.1. Estructura del gen y la proteína BRCA1	29
2.2. Rol de BRCA1 en la co-regulación de la transcripción.....	30
2.3. Rol de BRCA1 en la reparación del daño en el ADN	33
2.4. Maquinaria de respuesta al daño en el ADN.....	34
2.5. ATM en la respuesta al daño en el ADN.....	35
2.6. ATM y riesgo de cáncer	37
2.7. Evidencias previas para el rol de BRCA1 en el PCa.....	38
CAPITULO III. Rol de BRCA1 y CtBP1 en el metabolismo de la célula tumoral	40
3.1. Metabolismo y cáncer.....	41
3.2. CtBP1	43
3.3. Regulación de la transcripción de BRCA1	45
HIPOTESIS y OBJETIVOS	48
Objetivos específicos.....	49

MATERIALES y MÉTODOS.....	51
CAPITULO I. Líneas celulares, tratamientos, reactivos y plásmidos.....	52
1.1. Condiciones de crecimiento de las líneas celulares	53
1.2. Mantenimiento de las líneas celulares	53
1.3. Generación de líneas celulares estables	53
1.4. Tratamiento de células con agentes quimioterapéuticos.....	55
1.5. Tratamiento de células con otros agentes.	55
1.6. Plásmidos.....	56
1.7. Transformación de plásmidos en bacterias.....	61
1.8. Obtención y purificación del ADN plasmídico.....	62
CAPITULO II. Métodos para el análisis de la expresión de genes, proteínas y ensayos celulares	63
2.1. Western blot	64
2.1.1. Aislamiento de proteínas totales para Western blot	64
2.1.2. Cuantificación de proteínas totales: Método de Bradford	64
2.1.3. Método del ácido bicinconínico (BCA).....	65
2.1.4. SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	65
2.1.5. Western blot.....	65
2.2. Análisis de expresión génica a nivel de ARN mensajero	66
2.2.1. Aislamiento de ARN.....	66
2.2.2. Obtención del ADNc: Transcripción reversa o retro-transcripción (RT)	67
2.2.3. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)	68
2.3. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	70
2.3.1. Crosslink	70
2.3.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	71
2.3.3. Inmunoprecipitación.....	71
2.3.4. Amplificación del ADN del ChIP	72
2.4. Ensayo de genes reporteros.....	74
2.4.1. Transfección transiente por el método de lipofectamina 2000.....	74
2.4.2. Medición de actividad de luciferasa.....	75
2.5. Ensayo de transformación celular y formación de focos	75
2.6. Ensayo clonogénico por formación de focos.....	75
2.7. Ensayo de viabilidad celular (MTS).....	76
CAPITULO III. Estudios in vivo	77

3.1.	Experimentos con xenotransplantes.....	78
3.2.	Ratones C57BL6J	79
3.3.	Determinaciones bioquímicas	79
3.4.	Radio-inmuno ensayo (RIA) para la determinación de los niveles de testosterona y estradiol séricos e intratumorales	80
3.5.	Determinación de los niveles de NAD ⁺ y NADH	81
3.6.	Cortes histológicos	82
3.6.1.	Tinciones especiales.....	82
3.6.2.	Tinciones inmunohistoquímicas (IHQ).....	82
3.7.	Análisis estadístico	83
RESULTADOS		84
CAPITULO I.		85
1.1.	Regulación transcripcional de genes por BRCA1	86
1.2.	El daño en el ADN y co-reguladores de la transcripción modulan la expresión de ATM	87
1.3.	BRCA1 se asocia al promotor de ATM	89
1.4.	E2F1 se asocia al promotor de ATM.....	92
1.5.	Rol de BRCA1 en la regulación de la expresión de ATM	93
1.5.1.	BRCA1 induce la transcripción de ATM	93
1.5.2.	El daño en el ADN reprime la transcripción de ATM aún en presencia de BRCA1	94
1.5.3.	ATM regula su expresión a través de una retroalimentación positiva mediado por la fosforilación de BRCA1	95
1.5.4.	La inducción de la transcripción de ATM mediada por BRCA1 aumenta la actividad de ATM	96
1.6.	E2F1 reprime la transcripción de ATM durante la respuesta al daño en el ADN.....	98
1.7.	El silenciamiento de la expresión de BRCA1 disminuye la expresión de ATM <i>in vivo</i>	99
1.8.	CtIP se asocia al promotor de ATM	100
1.9.	CtIP induce la transcripción de ATM.....	101
1.10.	Conclusiones	102
CAPITULO II		104
2.1.	Efecto de las hormonas (andrógenos y estrógenos) sobre la regulación transcripcional de BRCA1 en células de PCa	105

2.1.1. Las líneas tumorales de próstata presentan distintos niveles de expresión de BRCA1.....	105
2.1.2. La testosterona regula la transcripción de BRCA1 en líneas celulares de PCa.....	106
2.1.3. La regulación de la expresión de BRCA1 por testosterona es mediada por su conversión a estrógenos en células PC3 pero no en células LNCaP	107
2.1.4. BRCA1 y CtBP1 se asocian al promotor de BRCA1	108
2.2. Estudiar la influencia de la dieta hipercalórica (similar a una baja relación NAD+/NADH) sobre el desarrollo tumoral.....	110
2.2.1. Generación de líneas celulares de PCa con expresión estable de distintos niveles de CtBP1.....	110
2.2.2. La sobre-expresión de CtBP1 aumenta la capacidad de transformar células in vitro	112
2.2.3. La sobre-expresión de CtBP1 aumenta la viabilidad de las líneas celulares de PCa, aún en baja concentración de SFB.....	113
2.2.4. La dieta suplementada con grasa es capaz de generar síndrome metabólico en ratones nude o C57BL6J.....	114
2.2.5. La dieta hipercalórica y el silenciamiento de la expresión de CtBP1 disminuyen el desarrollo tumoral prostático in vivo.....	117
2.2.6. Caracterización histológica de los tumores obtenidos por inoculación con las diferentes líneas celulares de PCa.....	118
2.2.7. La dieta hipercalórica genera un incremento en los niveles de NADH y variaciones de las hormonas intratumoral	120
2.2.8. La modulación de la expresión de CtBP1 en los xenotransplantes regula la transcripción de BRCA1 in vivo	121
2.2.9. La dieta hipercalórica y la sobre-expresión de CtBP1 aumentan la viabilidad celular in vitro	122
2.2.10. La viabilidad de las células de PCa que sobre-expresan CtBP1 disminuye en presencia de testosterona y sueros de animales alimentados con dieta hipercalórica	123
2.3. Conclusiones	124
DISCUSIÓN.....	126
CAPITULO I	128
1. Rol de BRCA1 en la regulación de la transcripción en respuesta al daño en el ADN	128

CAPITULO II	131
2.1. Regulación transcripcional de BRCA1 por estímulos hormonales.....	131
2.2. La dieta como factor de riesgo en el cáncer de próstata a través de la modulación transcripcional de BRCA1	133
REFERENCIAS	137
APÉNDICE	146

PUBLICACIONES

Los contenidos presentes en este trabajo de Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones.

1. **Moiola C**, De Luca P, Cotignola J, Gardner K, Vazquez E, De Siervi A.
“Dynamic coregulatory complex containing BRCA1, E2F1 and CtIP controls ATM transcription.” *Cell Physiol Biochem.* 30(3):596-608 (2012).

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

1. De Luca P, Vazquez ES, **Moiola CP**, Zalazar F, Cotignola J, Gueron G, Gardner K, De Siervi A.
“BRCA1 loss induces GADD153-mediated doxorubicin resistance in prostate cancer.” *Mol Cancer Res.* 9(8):1078-90 (2011).
2. De Siervi A, De Luca P, Byun JS, Di LJ, Fufa T, Haggerty CM, Vazquez E, **Moiola C**, Longo DL, Gardner K.
“Transcriptional autoregulation by BRCA1.” *Cancer Res.* 70(2):532-42 (2010).

ABREVIATURAS

- ADNc = ADN copia
- ADN = Ácido desoxirribonucleico
- AF-1 = *Anti secretory factor 1*
- AP1 = *Activator protein 1*
- APS = Persulfato de amonio
- AR = Receptor de andrógenos
- ARN = Ácido ribonucleico
- ARNm = Ácido ribonucleico mensajero
- ATF1 = *Activating transcription factor 1*
- ATM = *Ataxia telangiectasia mutated*
- ATR = *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*
- BARD1 = *BRCA1 associated RING domain 1*
- BCA = Ácido bicinconínico
- Bcl-2 = *B-cell CLL/lymphoma 2*
- Beads = Esferas de proteína G acopladas a agarosa
- BMI = Índice de masa corporal (body mass index)
- BPH = Hiperplasia prostática benigna
- BRCA1 = Gen de la susceptibilidad al cáncer de mama 1 (Breast Cancer susceptibility gene 1)
- BRCA2 = Gen de la susceptibilidad al cáncer de mama 2 (*Breast Cancer susceptibility gene 2*)
- BRCT = Dominio carboxi-terminal tipo BRCA1 (BRCA1 carboxy-terminus)
- BSA = Seroalbúmina bovina
- CBP = CREB binding protein
- ChIP = Inmuno-precipitación de la cromatina.
- ChIP-chip = Inmuno-precipitación de la cromatina seguida de *microarrays* de promotores.
- ChIP-qPCR = Inmuno-precipitación de la cromatina seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, en tiempo real.
- Chk1 = *Checkpoint kinase 1*
- Chk2 = *Checkpoint kinase 2*
- c-Myc = *V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*
- CREB = Elementos de respuesta a cAMP
- CRPC = Cáncer de próstata resistente a la castración
- CtBP = *C-terminal binding protein*

CtIP = *CtBP interacting protein*
 DDB2 = *Damage-specific DNA binding protein 2*
 DHT = Dihidrotestosterona
 DMSO = Dimetilsulfóxido.
 dNTPs = Desoxi-nucleotido tri-fosfato
 D.O = Densidad óptica
 DRE = Examen digital rectal
 DSB = Ruptura de ADN doble cadena
 dT = Desoxi-timidina
 DTT = Ditiotreitól
E. coli = *Escherichia coli*
 EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético
 EGTA = Ácido etilenglicoltetraacético
 EMT = Transición epitelio-mesénquima.
 ER = Receptor de estrógenos
 ERE = Sitios de unión del receptor de estrógenos
 GADD153 = Growth arrest and DNA damage 153
 Gal4 = Galectina 4
 H&E = Hematoxilina y eosina
 H2AX = Histona de la familia H2A, miembro X
 HDAC1 = *Histone deacetylase 1*
 HDAC 2 = *Histone deacetylase 2*
 HEPES = 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
 HRP = Peroxidasa de rabanita (horse radish peroxidase)
 IGF1 = Factor de crecimiento tipo insulina 1
 IGF-IR = Receptor 1 del factor de crecimiento tipo insulina
 IHQ = Inmuno-histoquímica
 i.p. = intra-peritoneal
 IP buffer = Buffer de inmuno-precipitación
 IR = Radiación ionizante
 KU 55933 = 2-(4-Morpholinyl)-6-(1-thianthrenyl)-4H-pyran-4-one
 LTZ = Letrozole
 MAD2L1 = *Mitotic arrest deficient-like 1 (Mad2)*
 MEF = Fibroblastos embrionarios de ratón
 MES = células madre embrionarias de ratón
 MRE11 = *Meiotic recombination 11*

MTS = 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil)-
2Htetrazolio

NAD⁺ = Nicotinamida adenine dinucleótido oxidada

NADH = Nicotinamida adenine dinucleótido reducida

NBS1 = *Nijmegen breakage syndrome 1 protein*

NCI = National Cancer Institute

NIH = National Institutes of Health

NKX3.1 = *NK3 homeobox 1*

NRB2 = *Neighbor of BRCA1 gene 2*

PARP = Poli-ADP ribosa polimerasa

pb = pares de bases

PBS = Buffer salino fosfato

PCa = Cáncer de Próstata

PCNA = *Proliferating cell nuclear antigen*

PIA = Atrofia inflamatoria proliferativa

PIN = Neoplasia intraepitelial prostática

PMS = Fenazina metosulfato

PMSF = Fenil metil sulfonil fluoruro

PR = Receptor de progesterona

primers = Oligos

PSA = Antígeno prostático específico

PTEN = *Phosphatase and tensin homolog*

qPCR = Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, en tiempo real.

Rb = Retinoblastoma

RE = Retículo endoplasmático

RIA = Radio-inmuno ensayo

RT = Retrotranscripción, transcripción reversa

RT-qPCR = Retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, en tiempo real.

s.c. = sub-cutáneo

SDS = Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE = Electroforesis en geles de poli-acrilamida con SDS

SFB = Suero fetal bovino

SSB = Ruptura de ADN simple cadena

STAT1 = *Signal transducer and activator of transcription 1*

TAD = dominio de activación transcripcional

TAE = Solución de Tris, Acético y EDTA

TE = Solución Tris-EDTA

TEMED = Tetrametilenetilendiamina

TFIIH = Factor de transcripción IIH

TFIIE = Factor de transcripción IIE

TNF- α = Factor de necrosis tumoral alfa

TSS = Sitio de iniciación de la transcripción.

UV = Ultravioleta

WB = Western blot

XIAP = *X-linked inhibitor of apoptosis*

XPC = *Xeroderma pigmentosum, complementation group C*

ZBRK1 = *Zinc finger and BRCA1-interacting protein with a KRAB domain 1*

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

El cáncer de próstata

1.1. La próstata: aspectos generales

La próstata es una glándula sexual accesoria que se ubica frente al recto, rodeando a la uretra en la base de la vejiga y forma parte del sistema reproductivo del hombre (Figura 1). Su función principal es la de producir secreciones que comprenden la principal fracción del plasma seminal (aproximadamente 30%), brindando nutrientes y protección a los espermatozoides contenidos en el semen eyaculado. Dentro de sus productos de secreción se encuentran las proteínas fosfatasa ácida, seminina, activador de plasminógeno y antígeno prostático específico (PSA). Este último es una serino-proteasa 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 (Balk et al, 2003). Además, la importancia de esta proteína radica en que es utilizada como el marcador más importante para la detección de cáncer de próstata (PCa), debido a que sus niveles séricos son muy sencillos de determinar y varían específicamente con perturbaciones en la glándula.

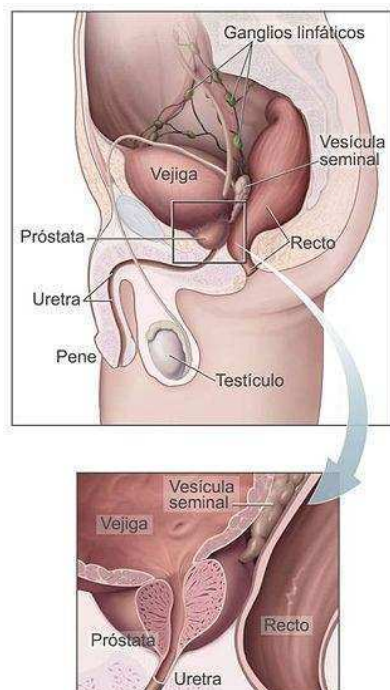


Figura 1. Esquema anatómico de la ubicación de la próstata en el cuerpo humano y magnificación de la región prostática. (Extraído de <http://www.cancer.gov>, Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU.)

El desarrollo y las funciones de la próstata son completamente dependientes de los andrógenos. El metabolito responsable de estas acciones es la dihidrotestosterona (DHT), un producto de la reducción de testosterona por la acción de la enzima 5- α reductasa en las células de la próstata (Debes & Tindall, 2002). Se determinó además que la DHT presenta mayor afinidad que la testosterona por el receptor de andrógenos

(AR), el factor de transcripción responsable de gatillar las señales provocadas por los andrógenos.

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

Una próstata sana tiene aproximadamente 3 cm de longitud. Consta de una porción glandular que comprende dos tercios de la misma y un tercio de otra porción fibromuscular. Según su morfología y función se distinguen las siguientes zonas (Figura 2):

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.

1.2. Patologías asociadas a la próstata

Existen un alto número de patologías asociadas a la próstata que traen como consecuencia generalmente problemas o dificultades al momento de orinar, una alta frecuencia de orinado, sorpresiva y urgente necesidad de orinar o dolor durante la eyaculación, entre otros síntomas descritos (Prostate Cancer Overview. American Cancer Society. www.cancer.org). Entre las patologías descritas mencionamos las más frecuentes (Figura 2):

- **Prostatitis:** es una inflamación de la próstata que ocurre en aproximadamente entre un 10 % y un 15 % de los hombres. Según la clasificación de los Institutos Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (NIH-EE.UU.), se lo

clasifica en 4 categorías: bacteriana aguda (tipo I); bacteriana crónica (tipo II); prostatitis crónica/síndrome de dolor pelviano crónico (tipo III), que a su vez se divide en inflamatoria (tipo IIIA) o no inflamatoria (tipo IIIB); y asintomática (tipo IV) (Krieger et al, 1999).

- Hiperplasia benigna prostática (BPH):** consiste en un crecimiento no maligno en el tamaño de la próstata. Se cree que su etiología es multifactorial involucrando tanto factores ambientales como genéticos. También, puede producirse por un aumento relativo de los estrógenos sobre la testosterona que aparece en los hombres mayores de 60 años. Es por ello que la incidencia del BPH se incrementa con la edad y se estima que el 70 % de los hombres de 70 años han desarrollado esta patología. Aunque generalmente es asintomática, algunos pacientes pueden sufrir síntomas obstructivos del tracto urinario (Harik & O'Toole, 2012).
- Cáncer de próstata:** es uno de los tipos de cáncer más comunes en los hombres. Se presenta frecuentemente en forma latente y se estima que entre un 15 % y un 30 % de los individuos por encima de 50 años de edad y un 80 % de los hombres por encima de los 80 años presentan PCa microscópico no diagnosticado (Taichman et al, 2007). Nos focalizaremos en esta patología más adelante en esta sección.

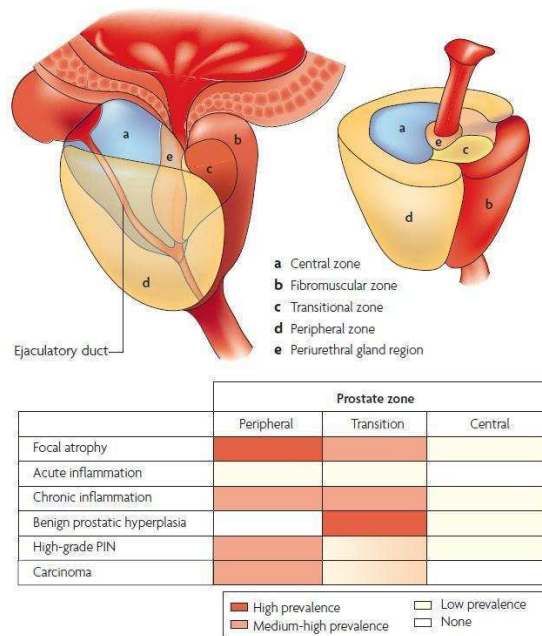


Figura 2. Lesiones encontradas en la próstata según su prevalencia y localización en las zonas glandulares prostáticas. (Extraído de (De Marzo et al, 2007))

1.3. Aspectos generales del cáncer

El cáncer es una enfermedad “multifactorial” que se refiere al crecimiento anormal de las células de un organismo que se dividen de manera descontrolada y son capaces de invadir tejidos distantes del lugar de origen. El proceso de tumorigénesis, que provoca la transformación de una célula normal a una célula maligna, se desarrolla en varias etapas a través de defectos en los circuitos regulatorios de las células afectando y alterando su proliferación y homeostasis. En las últimas décadas se ha trabajado incesantemente para comprender los mecanismos que llevan a la tumorigénesis, y a partir de estas investigaciones se han podido determinar características claves que comparten todos los tipos de cánceres (Hanahan & Weinberg, 2011).

Dentro de estas características se encuentran (Figura 3):

- **Auto-abastecimiento y mantenimiento de señales de crecimiento:** las células tumorales presentan hiperactivación de la proliferación a través de la estimulación autócrina y/o parácrina, de las células circundantes, de señales mitogénicas.
- **Insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento:** las células tumorales son capaces de evadir las señales anti-proliferativas, evitando entrar en procesos de quiescencia y de arresto de ciclo celular, al anular por ejemplo, las señales desencadenadas por algunos supresores tumorales.
- **Resistencia a muerte celular programada:** esta característica es adquirida en las células tumorales a través de la activación de proteínas que desencadenan señales anti-apoptóticas, como por ejemplo los miembros de la familia Bcl-2, y/o al bloqueo de los efectos de genes supresores tumorales que son efectores de señalización para apoptosis, como p53.
- **Potencial replicativo ilimitado:** las células tumorales son “inmortales” ya que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sorteando los mecanismos que las conducen a senescencia y muerte celular. Estas células al re-expresar la enzima telomerasa, evitan desencadenar los procesos antes mencionados, al proteger y mantener un tamaño adecuado en el largo de los telómeros de los cromosomas.
- **Inducción de angiogénesis:** las células tumorales son capaces de inducir angiogénesis al secretar factores que estimulan la formación de nuevos vasos, como por ejemplo el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y de esta manera asegurarse el transporte de oxígeno y nutrientes a todas las regiones del tumor en crecimiento.

- **Activación de procesos de invasión y metástasis:** por pérdida de expresión de moléculas de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular, las células tumorales son capaces de ingresar en un proceso conocido como transición epitelio-mesenchima (EMT) y de esta manera escapar del lugar donde se originaron y migrar a otros sitios donde posteriormente adoptaran nuevamente el fenotipo epitelial y desarrollarán una metástasis.

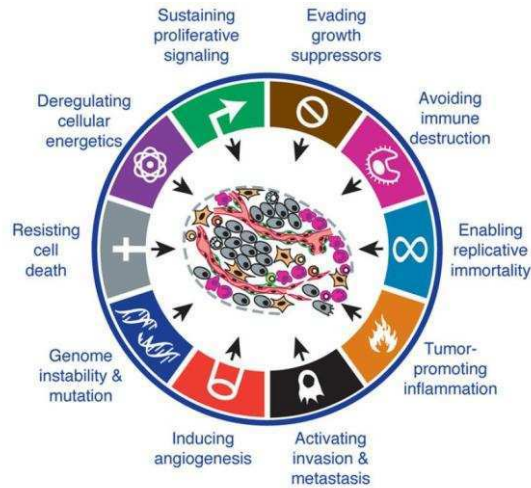


Figura 3. Esquema que representa las características claves que las células tumorales deben adquirir para garantizar su éxito y poder desarrollarse. (Extraído de Hanahan & Weinberg) (Hanahan & Weinberg, 2011)

Todas estas características son comunes a todos los tipos de cáncer, y les confieren a las células tumorales la capacidad para sobrevivir, proliferar y diseminarse. Sin embargo, los mecanismos que llevan a que estas células adopten dichas características son muy variables y dependen principalmente de 2 factores claves; su **inestabilidad genómica**, que genera mutaciones al azar y re-arreglos cromosómicos en las células tumorales, así como también un **estado inflamatorio crónico** que favorezca la progresión del tumor (Figura 3).

Al mismo tiempo debemos mencionar que para que el tumor pueda desarrollarse y mantenerse las células deben **reprogramar su actividad metabólica energética** de manera de afrontar un continuo crecimiento y proliferación al igual que deben ser capaces de **evadir los ataques de células del sistema inmune no asociadas al tumor** (Figura 3).

En resumen, cada uno de estos cambios fisiológicos permite que las células adquieran características distintivas, novedosas y ventajosas que les permitirán tener éxito frente a las células normales y colonizar tejidos distantes. En este trabajo de tesis

estudiaremos algunos mecanismos relacionados con la inestabilidad genómica y el desbalance energético celular en el PCa.

1.4. Incidence del cáncer en la población

El cáncer es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda causa de muerte en países en desarrollo (Jemal et al, 2011). El proyecto GLOBOCAN 2008 tiene como objetivo estimar las tasas de incidencia, mortalidad y prevalencia de todos los tipos de cáncer a nivel mundial, discriminando las mismas, por sexo y edad. A partir de estas estimaciones se ha podido determinar que el cáncer de mama en mujeres y el cáncer de pulmón en hombres son los más frecuentemente diagnosticados y los principales causantes de muerte por cáncer en el mundo, exceptuando al PCa, que es el más frecuente en hombres en países desarrollados (Figura 4).

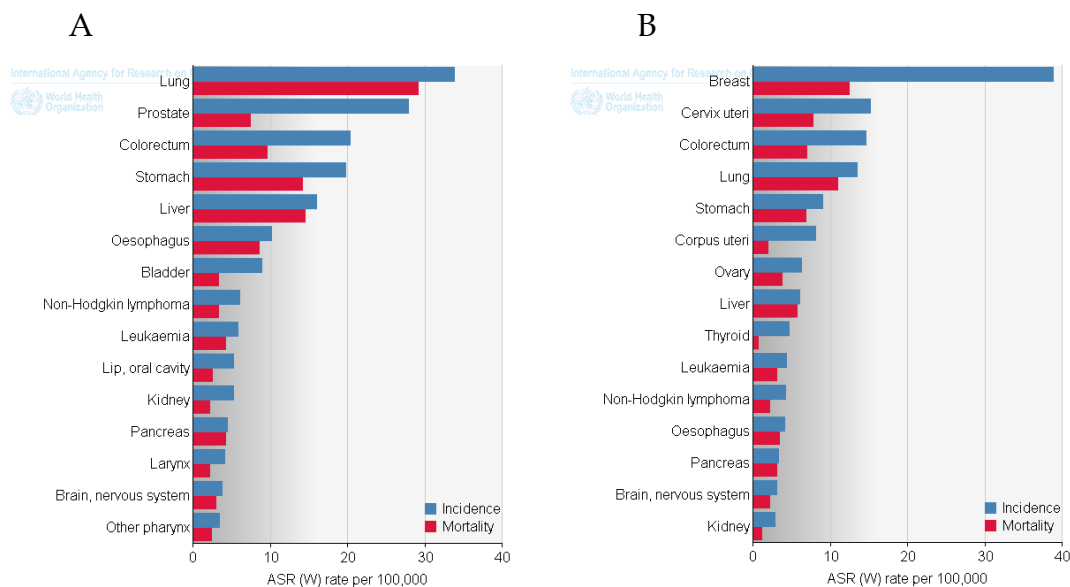


Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad de diversos tipos de cáncer en A) hombre; B) mujer; a nivel mundial. Datos aportados por el proyecto GLOBOCAN 2008 (<http://globocan.iarc.fr/>).

1.5. Incidence del PCa en la población

El PCa es el segundo tipo de cáncer más frecuente y la sexta causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo, representando el 14% del total de los casos y el 6% del total de muertes por cáncer en 2008 (Jemal et al, 2011). Las tasas de incidencia de PCa varían en más de 25 veces globalmente, con las tasas más elevadas en los países de Oceanía, Europa y del norte de América y una menor incidencia en países de Asia (GLOBOCAN 2008). En la Argentina, el PCa es el de mayor incidencia y el

segundo en mortalidad detrás del cáncer de pulmón (Instituto Nacional de Cáncer, Ministerio de salud de la Nación, <http://www.msal.gov.ar/inc/>). (Figura 5)

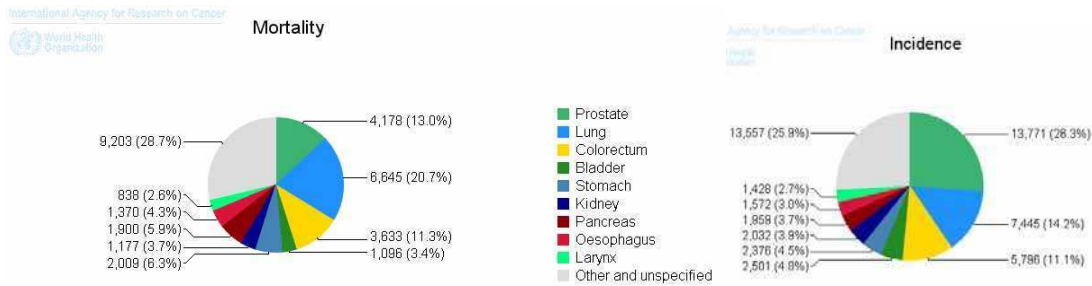


Figura 5. Tasas de mortalidad e incidencia de diferentes tipos de cáncer en el hombre en la población argentina. El PCa es el de mayor incidencia y el segundo en mortalidad en la Argentina. Datos extraídos del proyecto GLOBOCAN 2008 y del Instituto Nacional de Cáncer de la Argentina.

1.6. Características y etapas del PCa

El PCa es una enfermedad que se presenta generalmente de forma latente e indolora sin ocasionar síntomas clínicos en pacientes de edad avanzada. Sin embargo también puede tornarse sumamente agresivo y diseminarse más allá de la próstata a los tejidos cercanos como vejiga, vesícula seminal y recto o metastatizar a los nódulos linfáticos, hueso, pulmón u otros órganos (Schulz et al, 2003). Su prevalencia es tan alta que algunos autores la consideran como una patología “normal” asociada a la edad de los hombres. Estudios realizados en autopsias de hombres que murieron por causas diferentes a PCa, muestran que un alto porcentaje de los individuos presentaban esta enfermedad en forma localizada (Selley et al, 1997).

Previamente describimos algunas patologías asociadas a la próstata. En esta sección describiremos en detalle los eventos y las etapas que son consideradas fundamentales en el desarrollo de esta enfermedad.

Histológicamente, muchas lesiones en la próstata que contienen infiltrados inflamatorios crónicos o agudos son asociadas con atrofia focal del epitelio de la glándula. Esto generalmente ocurre en la zona periférica de la próstata y como respuesta a un proceso inflamatorio. En estas lesiones, se observa un incremento en la proliferación de las células epiteliales, por lo que se la denomina **atrofia proliferativa inflamatoria (PIA)** (De Marzo et al, 2007). Las células epiteliales de estas regiones muestran un fenotipo intermedio entre células basales y luminales maduras. Éstas células presentan alta tasa de proliferación y están sujetas a procesos moleculares de stress, lo cual en algunas células puede desencadenar inestabilidad genética y promover la transición hacia un estadio de mayor progresión de la

enfermedad (Nelson et al, 2003). Se ha establecido que en las zonas adyacentes a las lesiones de PIA se observan zonas con otro tipo de lesión pre-neoplásica denominada **neoplasia intraepitelial prostática (PIN)**. Esta se refiere al paso previo al establecimiento y desarrollo del tumor en el tejido prostático. El PIN se caracteriza por una proliferación celular de las células epiteliales del ducto prostático principalmente en la zona periférica de la glándula observándose una marcada heterogeneidad genética y pérdida de diferenciación celular. Histológicamente pueden distinguirse dos etapas de esta lesión, PIN de bajo grado y PIN de alto grado, resultando de significativa importancia clínica esta determinación ya que la presencia de estas lesiones se encuentran fuertemente asociados con el desarrollo del carcinoma. Al igual que el PCa, estas lesiones son multifocales y su incidencia se incrementa con la edad. La aparición de PIN de alto grado, suele preceder a la del carcinoma al menos en 10 años, ya que éste es el período necesario para que ocurra la progresión tumoral (Abate-Shen & Shen, 2000) (Figura 6A).

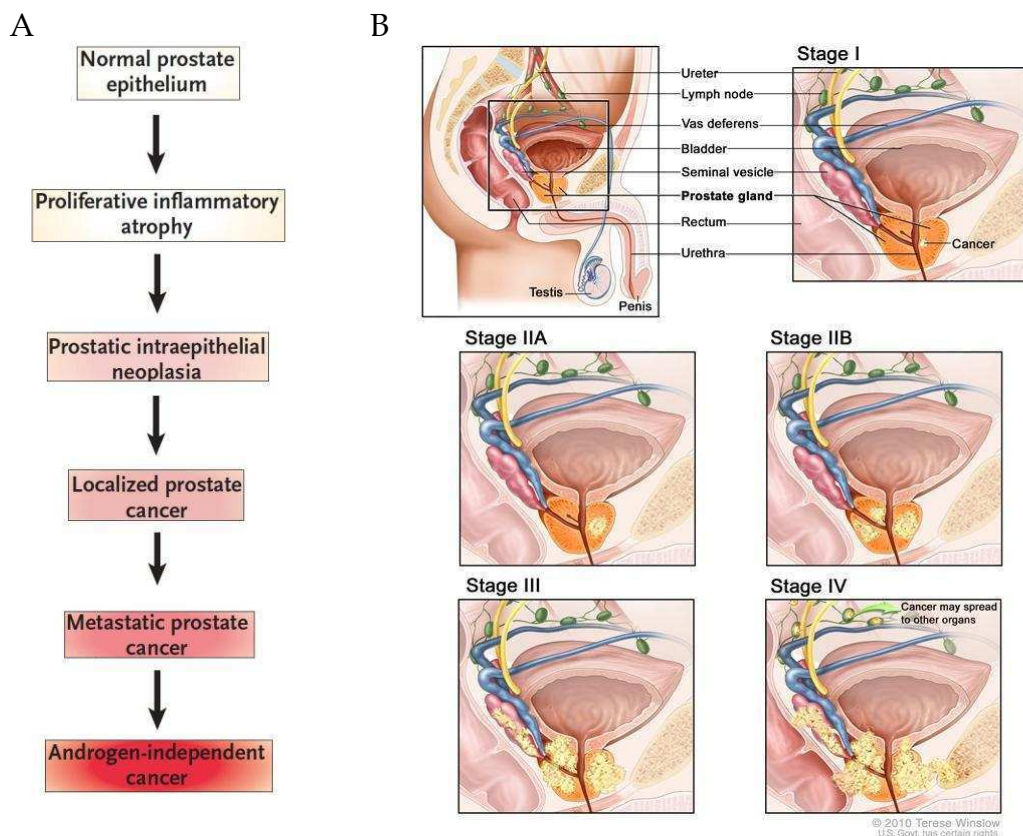


Figura 6. Esquema representativo de las etapas de desarrollo del PCa. A) Diagrama de flujo representando el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas hasta el establecimiento de PCa y sus etapas posteriores. (Extraído de (Nelson et al, 2003)); **B)** Ilustración de la localización de tumor de próstata y su propagación a lo largo de las diferentes etapas a las diferentes regiones del organismo. (Extraído de Instituto Nacional del Cáncer, Institutos Nacionales de la Salud, EE.UU. (NCI-NIH)).

La primera evidencia histológica de cáncer es una progresiva pérdida de la membrana basal en la glándula, seguido de anomalías en los marcadores de diferenciación, incremento en el tamaño del núcleo de las células y variación del contenido genómico ocasionando inestabilidad genómica, y un aumento en la proliferación celular. En esta etapa, se pueden distinguir varios estadios de progresión de la enfermedad. El primer estadio (**Estadio I**), consiste en **cáncer localizado** en la cápsula de la próstata, es asintomático, pero en caso de ser detectado, generalmente se adopta una postura de seguimiento evaluando los niveles séricos de PSA y tacto prostático por examen digital del recto (DRE). Dependiendo de los resultados de estos exámenes, en ocasiones se solicita una biopsia prostática para precisar el diagnóstico. En el **estadio II** aún localizado en la glándula prostática, el tumor ya puede ser detectado mediante DRE, mientras que en el **estadio III**, se observa diseminación de las células tumorales hasta las vesículas seminales. A estos últimos 2 estadios también se los conoce como **PCa localmente avanzado**. En el **estadio IV**, también conocido como **metastásico**, las células tumorales metastatizan principalmente a hueso, ocasionando lesiones osteolíticas, que causan mucho dolor y reducen la movilidad de los pacientes (Figura 6B). El tratamiento en los estadios I a III de la enfermedad es la terapia hormonal, donde los pacientes responden muy bien durante los primeros años de tratamiento. Sin embargo al cabo de un tiempo las células tumorales se vuelven resistentes a la ablación de andrógenos y progresan de manera descontrolada nuevamente. Es en este momento que se reconoce un estadio final de la enfermedad, denominado **cáncer recurrente o resistente a castración**, en donde la terapia de ablación de andrógenos ya no es más efectiva. Durante este estadio la terapia se focaliza solo en mejorar la supervivencia y calidad de vida del paciente ya que aún no se han identificado o generado tratamiento para este estadio de la enfermedad (NCI – NIH. www.cancer.gov).

Los carcinomas de próstata se clasifican en distinto grado según sus características histológicas, lo que se denomina grado de *Gleason*. De acuerdo a este sistema, al patrón histológico más representativo del tumor se le asigna un grado de 1 a 5, a la segunda morfología histológica más prominente se le asigna otro grado, ambos grados son sumados y reportados como el grado de *Gleason* del tumor. El grado de *Gleason* 3 es el más frecuente en el PCa y consiste en glándulas pequeñas no fusionadas. Un grado de *Gleason* 4 consiste en glándulas pequeñas fusionadas y un grado de *Gleason* 5 consiste en láminas de células anaplásicas sin glándulas distinguibles. Generalmente, los tumores de PCa con un grado de *Gleason* de 5 a 7 son considerados de grado intermedio o moderadamente diferenciados y aquellos con

un grado de 8 a 10 son considerados de alto grado o pobremente diferenciados (Gleason, 1966).

1.7. Diagnóstico del PCa

Actualmente el método por excelencia de detección temprana del PCa es la medición de los niveles del PSA en sangre, junto con el examen digital rectal (DRE) de la próstata, que en conjunto determinan la realización o no de una biopsia. El PSA, como mencionamos anteriormente, es una serino-proteasa secretada por las células epiteliales de la próstata que puede ser detectada en sangre. Hace unos años se estableció que una concentración de PSA de 4 ng/ml en sangre o mayor, junto con el DRE y la biopsia de la próstata, permiten detectar la enfermedad aún cuando está localizada en la glándula (Taichman et al, 2007). El uso de este marcador ha permitido que el PCa pueda detectarse en estadios tempranos y en consecuencia se ha observado una disminución de los casos de pacientes que llegan al diagnóstico médico con una enfermedad ya metastásica (Shariat et al, 2008). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que este sistema no es lo suficientemente sensible ni específico para la detección del PCa clínicamente relevante, ya que los niveles elevados de PSA también pueden variar a causa de otras patologías prostáticas benignas, como infección, inflamación y la BPH. Este hecho ha provocado que en la actualidad el PCa sea sobre-diagnosticado; se estima que hoy en día se brinda tratamiento a 20 pacientes, de los cuales solo uno moriría por PCa (Taichman et al, 2007).

En resumen, el desafío actual es poder identificar a aquellos pacientes clínicamente relevantes que podrían ser curados con tratamiento y diferenciarlos de los que no requieren ninguna terapia y, por ende, no deberían ser expuestos a los efectos secundarios de las mismas. En este sentido constantemente se están realizando avances para identificar nuevos marcadores moleculares que mejoren el diagnóstico, seguimiento y terapia de los pacientes. En este trabajo de tesis proponemos aumentar el conocimiento de los mecanismos moleculares del PCa para la identificación de nuevos marcadores moleculares.

1.8. Alteraciones genéticas asociadas al PCa

El cáncer es una enfermedad genética producida por alteraciones múltiples en tres clases de genes: los oncogenes, los supresores tumorales y aquellos que participan

en la reparación del ADN. Estos cambios pueden ser genéticos o epigenéticos, causados por carcinógenos químicos, físicos o biológicos, entre otros. Como ocurre con todos los tipos de cáncer, el PCa es una enfermedad genética ocasionada por acumulaciones de mutaciones cromosómicas. En la gran mayoría de los casos, las mutaciones son somáticas, es decir se encuentran únicamente en las células tumorales del epitelio prostático. Cuando algunas mutaciones están presentes en las células germinales se transmiten de generación en generación y están presentes en todas las células del organismo. Esta última modalidad da lugar a los síndromes familiares de PCa, que constituyen entre el 13 y el 26% del total de estos tumores (Hsing & Chokkalingam, 2006). En la mayoría de estos síndromes las mutaciones son alélicas y de baja penetrancia, pero en el 5% las mutaciones son de alta penetrancia y se transmiten de forma autosómica dominante.

Los progresos en epidemiología y genética han permitido identificar numerosas mutaciones alélicas de baja penetrancia denominadas polimorfismos genéticos, que son relativamente más frecuentes y aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad. En base a todo esto algunos autores atribuyen hasta el 40% de todos los PCa a factores genéticos (Hsing & Chokkalingam, 2006).

Se han desarrollado numerosos estudios con el fin de identificar el o los genes responsables del PCa (Reynolds, 2008; Shand & Gelmann, 2006). De esta manera, se describieron numerosas vías moleculares desreguladas en la célula tumoral prostática debido a la alteración de la expresión de genes supresores de tumores y oncogenes.

La inestabilidad genómica es uno de los principales mecanismos de las células tumorales para progresar hacia un estadio de mayor agresividad y adoptar las características claves que les garantice su éxito para dividirse, proliferar y diseminarse. Las células tumorales muestran una alta frecuencia de eventos de re-arreglos cromosómicos teniendo como consecuencia la inserción, delección, amplificación o translocación de fragmentos de ADN cromosómicos.

El hecho de que a nivel molecular no se hayan podido encontrar los genes responsables del PCa hace suponer que esta enfermedad responde más bien a pequeños efectos de una gran variedad de genes.

A continuación describiremos las alteraciones genéticas que están específicamente asociadas al PCa:

1.8.1. Re-arreglos cromosómicos

Dentro de todos los re-arreglos cromosómicos observados en pacientes con PCa, los más frecuentemente observados ocurren en los autosomas 8, 13, 7, 10, 16, 6 y 17 en orden decreciente de aparición. También se observan alteraciones en los cromosomas sexuales X e Y con ganancia o amplificación de regiones de estos mismos (Reynolds, 2008).

Mediante estudios de hibridización comparativa genómica (CGH) pudo determinarse que las alteraciones en estos autosomas correspondía a la pérdida de los brazos 1p, 6q, 8p, 10q, 13q, 16q, 18q y una ganancia en 1q, 2p, 7, 8q, 18q y Xq. A partir de estos resultados y mediante FISH (fluorescence *in situ* hybridization) pudo determinarse con mayor precisión los genes afectados por estas alteraciones. Así fue como se identificaron las amplificaciones en los genes de AR (Xq12) y MYC (8q24) en pacientes con PCa refractarios. Por otro lado, las deleciones de fragmentos de cromosomas determinaron la pérdida de algunos supresores tumorales como PTEN (10q23), NKX3.1 (8p21), P27 (12p13) y RB (13q) (Reynolds, 2008).

1.8.2. Inactivación de genes supresores tumorales

Los genes supresores de tumores están asociados con la carcinogénesis del PCa. Debido a que los humanos somos organismos diploides, cuando una sola copia del supresor tumoral está mutada, su función es mantenida por la otra copia. En la clásica definición de un gen supresor tumoral, ambas copias del gen deben estar afectadas para que se desarrolle el tumor. En el PCa generalmente se observa la pérdida de un alelo por deleción del fragmento de DNA y posteriormente la inactivación transcripcional o mutación inactivante del alelo restante. Los genes supresores tumorales más importantes identificados en próstata son los siguientes:

- **PTEN:** la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) regula las vías de señales involucradas en la proliferación celular y la apoptosis de las células normales. La pérdida de su función contribuye a la progresión del cáncer. La deleción de PTEN en el cromosoma 10q23.3 ocurre en aproximadamente el 40% de los pacientes con PCa y está asociada con un aumento de metástasis, mal pronóstico de los pacientes y con la adquisición del fenotipo andrógeno independiente. Generalmente se observa pérdida del fragmento de ADN que lo contiene e inactivación del alelo restante por mutación puntual o silenciamiento por metilación de su región promotora (Hughes et al, 2005).
- **p53:** la proteína p53 desempeña un papel crítico en el control del ciclo celular, modulando el crecimiento y la proliferación celular. Mutaciones en este gen son muy comunes en todos los tipos de cáncer, a pesar de ello ocurren en muy

baja frecuencia en el PCa. Sin embargo, su expresión aberrante ha sido asociada a la progresión de PCa hacia estadios de hormono-independencia y desarrollo de metástasis óseas (Hughes et al, 2005).

- **RB:** su inactivación tiene un rol relevante en la transformación neoplásica, ya que induce la actividad del factor de transcripción E2F1 que interviene en la regulación de la progresión del ciclo celular regulando genes involucrados en la proliferación. Se localiza en una de las regiones cromosómicas más comúnmente delecionadas, mientras que la otra copia aunque generalmente se mantiene inalterada, en ocasiones sufre silenciamiento por metilación aberrante de su promotor (Hughes et al, 2005).
- **NKX3.1:** este gen específico de próstata es esencial en el desarrollo normal de la glándula. Se determinó que es capaz de unirse al ADN y reprimir la expresión de PSA. La pérdida de su expresión parecería ser que es uno de los eventos más tempranos en suceder y se relaciona con la progresión del PCa (Shand & Gelmann, 2006).
- **CDKN1B (p27^{KIP1}):** participa de la regulación del ciclo celular. Se lo utiliza como marcador de progresión para varios tipos de cáncer ya que se asocian concentraciones reducidas en su expresión con un pronóstico agresivo de las células tumorales. Si bien su expresión estaría más asociada a la pérdida de expresión de PTEN, este gen también está sujeto a deleciones por re-arreglos cromosómicos (Hughes et al, 2005).
- **GST1 (glutación S-transferasa):** una enzima detoxificante y anti-oxidante que participa en la prevención del daño en el ADN. Su inactivación se da principalmente por hiper-metilación de su promotor (Hughes et al, 2005).
- **BRCA1:** gen de susceptibilidad al cáncer de mama (BRCA1). Mutaciones germinales en este gen aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama, ovario (Miki et al, 1994) y están asociadas con una mayor agresividad y mal pronóstico del PCa (Agalliu et al, 2009; Gallagher et al, 2010). Recientemente, algunos autores además determinaron que las mutaciones de BRCA1 aumentan el riesgo de desarrollar PCa (Castro & Eeles, 2012; Leongamornlert et al, 2012).

1.8.3. Activación de oncogenes

La causa de la iniciación del PCa todavía no ha sido dilucidada y hasta el momento se identificaron muy pocos oncogenes involucrados en la tumorigénesis prostática. A

continuación mencionamos algunos de estos cuya expresión alterada contribuyen al desarrollo y progresión del PCa:

- **MYC:** es un factor de transcripción y uno de los oncogenes más comunes estudiados en la patogénesis del PCa. MYC regula numerosos genes y está localizado en la región cromosómica 8q24 que está frecuentemente amplificada en los pacientes con PCa. Estos eventos se asocian con PCa metastásico donde MYC se encuentra sobre-expresado (Hughes et al, 2005).
- **BCL-2:** participa en la regulación de la apoptosis siendo un gen anti-apoptótico. Aunque no se expresa en la próstata normal, se observa expresión de este gen tanto en PCa primario como metastásico. Su sobre-expresión se observa en aproximadamente la mitad de los PCa (Hughes et al, 2005).
- **TMPRSS2-ERG o ETS:** las translocaciones que fusionan el gen TMPRSS2 con ERG o los factores de transcripción ETS contribuyen el desarrollo del PCa. La expresión de la fusión TMPRSS2-ERG fue identificada en estadios tempranos de la tumorigénesis prostática, como por ejemplo PIN (Clark et al, 2007).

1.8.4. Alteraciones en el receptor de andrógenos

Los andrógenos son esenciales para el desarrollo y crecimiento de la próstata. La principal hormona androgénica en el hombre es la testosterona y su metabolito activo es la dihidrotestosterona.

El AR es un receptor nuclear de hormonas esteroideas que se une a la dihidrotestosterona en el citoplasma, dimeriza y transloca al núcleo. De esta manera, el receptor activo interacciona con las secuencias ubicadas en los sitios ARE (elementos respondedores a andrógenos) de los promotores promoviendo la transcripción de los genes blancos.

El gen del AR está localizado en la región del cromosoma Xq11-q12. Tiene 8 exones en un mRNA de 10 kb que produce una proteína de 919 aminoácidos. La proteína tiene tres dominios funcionales principales que son: el dominio de unión al DNA, el dominio de transactivación o modulador y el dominio de unión al ligando hormonal. El dominio de unión al DNA es codificado por los exones 2 y 3, y el dominio de unión a los andrógenos está codificado por los exones 4 al 8. El dominio N-terminal tiene la región de trans-activación que está codificada por el exón 1. Este exón tiene dos repeticiones polimórficas formadas por un triplete CAG en la región 5' que codifica para poli-glutamina y un tri-nucleótido GGC en la región 3' que codifica para poli-glicina. Existen variantes alélicas del gen del AR en la población general, lo que indica que es altamente polimórfico. Por lo tanto, existen diferentes alelos o variantes del gen

del AR que están dadas por el número de repeticiones CAG y GGC. El microsatélite CAG tiene una longitud normal de entre 11 a 31 repeticiones con un promedio de 20, mientras que la longitud normal del microsatélite GGC es de 16 repeticiones. En mujeres, el polimorfismo CAG ha sido relacionado con distintas patologías, entre ellas el cáncer de mama. Mientras que en hombres, este polimorfismo fue relacionado con síndrome de Kennedy, insensibilidad parcial o total a los andrógenos, PCa, azoospermia y oligospermia. Las variaciones en el tamaño del polimorfismo CAG han sido inversamente relacionadas con la actividad del receptor, ya que las repeticiones menores están relacionadas con un aumento intrínseco de la actividad del AR y con una variante más severa y de edad más temprana de PCa. Las repeticiones mayores están asociadas con baja actividad del receptor e infertilidad por oligospermia. También se ha encontrado una relación entre bajas repeticiones del otro polimorfismo, GGC y aumento del riesgo de desarrollar PCa (Shand & Gelmann, 2006).

Asimismo se han observado mutaciones sobre la secuencia del receptor que promueven una mayor actividad del mismo o pérdida de especificidad, pudiendo ser activado no solo por testosterona sino que también por factores de crecimiento u otras hormonas esteroideas al igual que una activación independiente de ligando (Schulz et al, 2003).

En resumen, a pesar de que existen numerosas evidencias que asocian las alteraciones genéticas con el PCa, aún no ha sido posible determinar el o los grupos de genes involucrados en la patogénesis de esta enfermedad. Más aún, se supone que el riesgo de desarrollar PCa no depende sólo de alteraciones de algunos de los genes mencionados, sino que también depende del contexto en donde estas alteraciones genéticas puedan desenvolverse. Es decir, la interrelación entre los factores genéticos y el ambiente u otros factores propios de cada individuo, pueden enmascarar o exacerbar las alteraciones genéticas favoreciendo, por ejemplo, la inestabilidad genómica, y propiciando procesos de transformación celular. Por consiguiente resulta fundamental conocer los factores que pueden predisponer o prevenir el desarrollo del PCa. A continuación describiremos algunos de estos factores.

1.9. Etiología del PCa

Como mencionamos, el PCa es una enfermedad multifactorial y se sabe que tanto factores genéticos como ambientales influyen el riesgo de desarrollar esta patología. Algunos autores clasifican a estos factores de riesgo como **endógenos o**

constitucionales (edad, historia familiar, perfil hormonal, raza) y **factores exógenos**, que corresponden con el estilo de vida del paciente (dieta, ocupación y exposición a diferentes agentes ambientales carcinogénicos) (Bostwick et al, 2004).

Recientemente, numerosos estudios epidemiológicos demostraron que tanto el estilo de vida como la dieta tienen un rol crucial en la biología y la tumorigénesis del PCa, influenciando no solo el desarrollo sino también la progresión de la enfermedad (Cheetham & Katz, 2011). A continuación describiremos brevemente los factores de riesgo conocidos asociados al desarrollo del PCa, para luego profundizar en aquellos que tienen mayor relevancia para nuestro estudio.

1.9.1. **Factores constitucionales o endógenos**

- **Edad**

Constituye uno de los factores de riesgo más importantes del PCa (Patel & Klein, 2009). Esta enfermedad se presenta usualmente en hombres mayores de 40 años y su frecuencia aumenta con la edad especialmente después de los 50 años. Se estima que al menos 65% de los hombres de más de 70 años tienen evidencia microscópica de PCa, pero afortunadamente su crecimiento es muy lento y los hombres en la tercera edad casi siempre fallecen de una causa diferente (Reynolds, 2008; Taichman et al, 2007).

- **Factores étnico-raciales y geográficos**

Las tasas de incidencia y mortalidad del PCa a nivel mundial varían notablemente de acuerdo a la ubicación geográfica y el origen étnico de las personas. Estas tasas tienden a ser más elevadas en países desarrollados que en aquellos que se encuentran en desarrollo. El PCa es más frecuente, más agresivo y aparece en edades más tempranas en varones afro-americanos. En África, Asia y Latinoamérica es menos frecuente aunque se postula que esto se debe más a factores dietarios que a étnicos, pues los asiáticos que viven en EE.UU presentan una mayor incidencia de PCa que aquellos que viven en Asia (Bostwick et al, 2004).

- **Factores genéticos, familiares y hereditarios**

Diversos estudios demuestran que aquellos hombres con historia familiar de PCa poseen mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad. Ha sido estimado que la presencia de 1 a 3 miembros de primer grado de la familia (padre o hermanos) con PCa aumenta el riesgo de desarrollar esta patología entre 2 y 10 veces (Nelson et al,

2003). Otros estudios demuestran que los hombres con historia familiar de cáncer de mama, también tienen un riesgo elevado en desarrollar PCa. Estas evidencias sugieren un rol genético y hereditario en estas patologías.

La población de judíos Askenazi presenta una alta incidencia de 3 mutaciones fundadoras en el supresor tumoral BRCA (BRCA1 185delA, BRCA1 5382insC y BRCA2 6174delT). En esta población se realizaron varios estudios epidemiológicos para determinar si la presencia de estas mutaciones afecta el riesgo de desarrollar PCa. Sin embargo todos los estudios realizados incluyen un número pequeño de individuos resultando en conclusiones contradictorias (Agalliu et al, 2009; Hubert et al, 1999; Struewing et al, 1997).

- **Factores hormonales**

Previamente explicamos la influencia de los andrógenos en el desarrollo del PCa. Los estrógenos también han centrado la atención de diversos estudios epidemiológicos para investigar su asociación con el PCa (Eaton et al, 1999).

Los estrógenos afectan el crecimiento y el desarrollo de la próstata, y esto ocurre por rutas indirectas en el eje hipotalámico-pituitario-gonadal, a través de la prolactina y también por efectos directos mediados por los receptores de estrógeno ER- α y los ER- β (Gillera et al, 2003; Harkonen & Makela, 2004).

ER- α y - β se expresan predominantemente en el estroma y en el epitelio de la glándula prostática, respectivamente (Harkonen & Makela, 2004). Se reportó que el ER- α se puede expresar aberrantemente en el epitelio prostático en algunos PCa. El ER- β se activa inicialmente en los primeros estadios del PCa, para ser fuertemente reprimido en estadios más avanzados (Leav et al, 2001).

La activación del ER- β parece limitar la proliferación de células directamente o a través de la inhibición del ER- α y, por ello, la pérdida de ER- β siempre se asocia con la progresión tumoral. Del mismo modo, se plantea la hipótesis de un mecanismo que afecta al ER- α , produciendo una expresión alterada del receptor y disrupción de los genes críticos del desarrollo e interferencia con el crecimiento y diferenciación de la glándula prostática. Sin embargo, los datos epidemiológicos disponibles no respaldan la asociación entre los niveles basales plasmáticos de estrógenos y el desarrollo de PCa.

1.9.2. **Factores exógenos**

- **Dieta**

Los hábitos alimenticios predisponen a las personas a ser vulnerables frente a un gran número de patologías. Numerosas evidencias determinaron que la dieta puede actuar como un factor de riesgo sumamente importante para el desarrollo de PCa. Esto se debe en parte a que en los alimentos que ingerimos existen moléculas que presentan propiedades protectoras para nuestro organismo, así como también agentes que favorecen o promueven la tumorigénesis prostática (Cheetham & Katz, 2011). Dentro de los alimentos que pueden provocar un desarrollo más agresivo del PCa se encuentran todos aquellos que contengan altos niveles de grasa de origen animal, como un elevado consumo de carnes rojas. De la misma manera, una alta ingesta calórica diaria se asocia con un elevado riesgo de desarrollar PCa. Por otro lado, existen alimentos que contienen moléculas que resultan ser beneficiosos para las personas que los consumen, como por ejemplo frutas, granos y cereales y productos derivados de soja entre otros, que aportan anti-oxidantes, micronutrientes y vitaminas a nuestro organismo (Cheetham & Katz, 2011).

En la actualidad se están abordando numerosos estudios para determinar los alimentos que resultan ser quimiopreventivos, es decir que aportan nutrientes o componentes que protegen al organismo del ataque de agentes tanto exógenos (patógenos) como endógenos (productos del metabolismo, ROS) (Cheetham & Katz, 2011). Una dieta quimiopreventiva debería incluir alto contenido de frutas y vegetales, junto con granos y cereales; de la misma manera deberían favorecerse el consumo de pescado y comidas derivadas de la soja manteniendo un mínimo consumo de carnes rojas (que presentan altos contenidos de aminas heterocíclicas, capaces de producir radicales libres) y productos lácteos. El aporte de grasas debería ser en forma de aceites, contribuyendo a mantener un balance entre grasas del tipo omega-6 y omega-3. También el consumo de hierbas como te verde (contiene compuestos polifenólicos como las catequinas con efecto anti-oxidante) y jengibre, entre otros es beneficioso aportando moléculas que resultan ser quimiopreventivas (Cheetham & Katz, 2011; Sonn et al, 2005).

Las frutas y vegetales además de aportar vitaminas (A, C, D, E) y minerales esenciales para el organismo, contienen altas concentraciones de moléculas anti-oxidantes (β -carotenos, como licopeno en el tomate), fibras, que contribuyen en la eliminación de carcinógenos del organismo, y fito-estrógenos (lignanos e isoflavonas), un grupo de moléculas también presentes en varios granos y semillas con propiedades anti-oxidante y anti-proliferativas. Todos estos compuestos han sido asociados con una reducción en el riesgo de desarrollar PCa, como alimentos quimiopreventivos (Bostwick et al, 2004; Cheetham & Katz, 2011).

Además, la ingesta de pescado y aceites principalmente de oliva, colabora con el aporte de grasas del tipo omega- 3 y -9, con efectos anti-oxidantes, y anti-inflamatorios al tiempo que reducen la ingesta de grasas insaturadas y grasas trans- con marcados efectos nocivos sobre el organismo. El pescado además aporta minerales como selenio con reconocido efecto protector sobre el cáncer de próstata (Bostwick et al, 2004).

En la actualidad existe una tendencia cada vez más marcada al acompañamiento de las terapias convencionales con una dieta rica y balanceada con el aporte de los nutrientes y moléculas descritas anteriormente. En la bibliografía existe información que demuestra el efecto de estos factores no solo en la prevención del PCa, sino también colaborando en una progresión más lenta y disminuyendo la recurrencia de la enfermedad en aquellos pacientes con PCa (Cheetham & Katz, 2011).

Por otro lado, la ingesta de alimentos con alto contenido graso, principalmente de origen animal, no solo contribuye a desarrollar un patrón de obesidad sino que también resulta ser un factor de riesgo para el desarrollo de PCa (Bostwick et al, 2004). La relación en grasas saturadas y trans- también se presentan como factores de riesgo que se correlacionan positivamente con el desarrollo de PCa al igual que la ingesta de productos lácteos. Aunque no se conoce claramente como una alta ingesta de grasas de origen animal induce la carcinogénesis prostática, se supone que al predisponer a los individuos a la obesidad, trae aparejado los efectos de esta última, como alteraciones en los niveles de hormonas séricas (testosterona/estrógenos), un incremento en los niveles de IGF-1, al tiempo que favorece procesos inflamatorios y de estrés oxidativo cuya asociación al PCa está comprobada (Cheetham & Katz, 2011).

- **Obesidad y alteraciones metabólicas**

El síndrome metabólico se refiere a alteraciones en el metabolismo del organismo cuyas características son: obesidad central, dislipidemia, hipertensión arterial y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Recientemente diversos trabajos han asociado al PCa con la presencia de síndromes metabólicos (De Nunzio et al, 2012).

Además, varios estudios previos demostraron que la obesidad se asocia con el aumento del riesgo de un alto grado del PCa (MacInnis & English, 2006; Rodriguez et al, 2007; Wright et al, 2007). Está establecido que el índice de masa corporal (BMI) elevado se asocia con un mal pronóstico y con la alta mortalidad de los pacientes con PCa (Giovannucci et al, 2007; Wright et al, 2007) y con la alta tasa de recurrencia bioquímica (Gong et al, 2007; Ma et al, 2008; Siddiqui et al, 2006).

A partir de estos antecedentes y debido al aumento de la prevalencia de la obesidad en la población mundial se desprende que es crucial entender el mecanismo por el cual la obesidad impacta en el desarrollo y progresión del cáncer. En este trabajo de tesis intentaremos aportar evidencias para dilucidar, al menos en parte, este mecanismo.

CAPÍTULO II

Rol de BRCA1 y otras proteínas relacionadas en la inestabilidad genómica en la etiología del PCa

En el capítulo I hemos mencionado algunos de los agentes etiológicos del PCa y de las alteraciones genéticas asociadas a esta patología. A continuación analizaremos en mayor detalle el papel que tiene la inestabilidad genómica y la regulación de la transcripción de genes importantes en estas vías para el desarrollo del PCa. En particular, nos focalizaremos en el gen supresor de tumores BRCA1 como eje de este trabajo de tesis. En primer lugar describiremos las características generales de BRCA1, las funciones en las que participa y el rol en la respuesta al daño en el ADN. Asimismo, mencionaremos los principales actores de las vías en la que BRCA1 está involucrado y finalmente presentaremos evidencias previas de la regulación transcripcional de BRCA1 y específicamente de su rol como co-regulador de la transcripción el cual es crucial para su función supresora tumoral.

2.1. Estructura del gen y la proteína BRCA1

El gen de la susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1, codifica para una proteína que ha sido reconocida como supresora tumoral. Se localiza en el cromosoma 17p12-21 y contiene 22 exones codificantes y 2 no codificantes, que dan origen a un transcripto primario de 7,8 kb generando una proteína de 1.863 aminoácidos (Miki et al, 1994). La región amino terminal de la proteína BRCA1 contiene un dominio en forma de anillo, con una estructura cys-his-cys. La región C-terminal contiene un dominio de activación transcripcional (TAD), que consta de alrededor de 300 aminoácidos (1560-1863) (Chapman & Verma, 1996; Monteiro et al, 1996). En esta región se encuentran repeticiones en tándem de aproximadamente 95 aminoácidos, llamadas BRCT (BRCA1 carboxy-terminus) (Bork et al, 1997) (Figura 7). Estos dominios BRCT son similares a los dominios carboxi-terminal encontrados en otras proteínas involucradas en los puntos de control del ciclo celular y reparación del ADN. Existe un segundo dominio de transactivación, denominado AD1 (aminoácidos 1293-1559), que puede activar la transcripción sinérgica o independientemente de TAD (Ye et al, 2001).

Varios grupos de trabajo intentaron dilucidar las funciones bioquímicas de la proteína BRCA1 siendo su rol en la respuesta al daño en el ADN y en la regulación del ciclo celular, claramente, sus funciones más importantes. También se determinó que BRCA1 es capaz de modular la expresión de genes involucrados en estos procesos y numerosas evidencias sugieren que esta proteína podría tener un rol en la regulación de la transcripción (Deng, 2006; Rosen et al, 2006; Somasundaram, 2003).

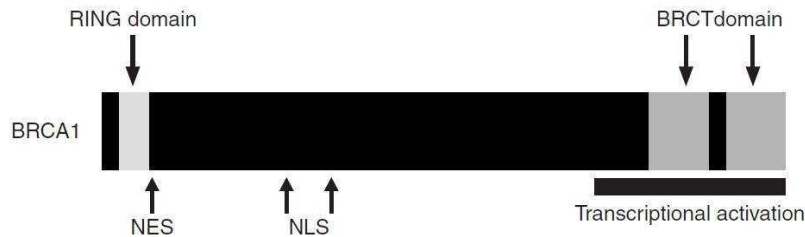


Figura 7. Esquema representativo de la estructura de BRCA1 y sus dominios estructurales. (Extraído y adaptado de (Yoshida & Miki, 2004)).

BRCA1 es una proteína de gran tamaño y se la ha encontrado asociada a numerosas proteínas involucradas en diferentes procesos biológicos. En la tabla 1 se muestran algunas proteínas con las que es capaz de interactuar. Por lo tanto, debido a estas interacciones, BRCA1 participa de numerosos procesos biológicos cruciales en la fisiología de la célula.

Proteins interacting with BRCA1

DNA repair	ATM, CHK2, ATR, BRCA2, RAD51, RAD50/ MRE11/NBS1, BASC, PCNA, H2AX, c-Abl
Transcription	RNA polymerase II holoenzyme (RNA helicase A, RPB2, RPB10 α), HDAC1, HDAC2, E2F, CBP/p300, SWI/SNF complex, CtIP, p53, androgen receptor, ATF1, STAT1, estrogen receptor α , c-Myc, ZBRK1
Cell cycle	RB, CDK2, p21, p27, BARD1
Others	BAP1, BIP1, BRAP2, importin α

Tabla 1. Proteínas que interactúan con BRCA1 y los procesos en los cuales participan. (Extraído de (Yoshida & Miki, 2004)).

Dentro de las funciones celulares más importantes que BRCA1 desempeña, debemos destacar su participación en:

- el control del ciclo celular
- la regulación de la apoptosis
- **la reparación del daño en el ADN**
- la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos
- **la co-regulación de la transcripción**

En las siguientes secciones nos detendremos en comentar los aspectos generales de la participación de BRCA1 en los procesos de regulación del daño en el ADN y co-regulación de la transcripción. Además profundizaremos en la asociación de estos procesos con la patogénesis del PCa.

2.2. Rol de BRCA1 en la co-regulación de la transcripción

Si bien hasta el momento no se conocen secuencias consenso de pegado al ADN para BRCA1, existen numerosos indicios indicando que esta proteína puede actuar como un co-regulador transcripcional.

La primera evidencia surgió al utilizar fusiones híbridas de BRCA1 con el dominio de unión al ADN de GAL4 en ensayos de genes reporteros (Chapman & Verma, 1996; Monteiro et al, 1996). De esa manera se determinó que el dominio BRCT de BRCA1 es capaz de activar la transcripción de promotores dependientes de GAL4 (Chapman & Verma, 1996; Monteiro et al, 1996).

Otra evidencia importante surgió al identificar a BRCA1 como parte de la maquinaria basal de la transcripción, a través de su interacción principalmente con la helicasa A (Anderson et al, 1998; Somasundaram, 2003). De la misma manera, se identificó que BRCA1 también interacciona con NUFIP y con el factor de elongación, P-TEFb, y de esta manera estimula la actividad de la RNA polimerasa II, en un mecanismo dependiente de la ciclina T1 (Cabart et al, 2004; Rosen et al, 2006).

Otro aspecto importante a mencionar es que BRCA1 interacciona con distintos componentes de la maquinaria de remodelación de la cromatina y con factores o co-reguladores de la transcripción (Tabla 1), incluídos el ER- α y el AR (Park et al, 2000). De esta manera BRCA1 es capaz de funcionar como un activador o represor transcripcional (Rosen et al, 2006; Somasundaram, 2003; Wang et al, 2000).

Nuestro grupo de investigación realizó numerosos aportes respecto al rol regulador de la transcripción de BRCA1. En colaboración con el Dr. Kevin Gardner (NCI-NIH, EE.UU) realizamos el primer estudio de ChIP-chip (inmuno-precipitación de la cromatina seguido de microarrays de promotores) que muestra la asociación directa de la proteína BRCA1 a más de 1000 promotores, lo cual fortalece su papel de co-regulador de la transcripción (De Siervi et al, 2010) (Figura 8). Estudiando la ontología de estos genes observamos que más del 90% de ellos están involucrados en la progresión del ciclo celular y la respuesta al daño en el DNA (Tabla 2).

Sorprendentemente, uno de los blancos de regulación transcripcional de BRCA1 resultó ser el propio BRCA1. En este trabajo encontramos que BRCA1 auto-regula su propia transcripción frente al estrés genotóxico a través de un mecanismo mediado por integrantes de la vía Rb/E2F1. La proteína BRCA1 forma un complejo con el factor de transcripción E2F1 que se asocia y reprime la transcripción de BRCA1. Luego de inducir daño en el DNA, este complejo se libera activando la expresión de BRCA1 (De Siervi et al, 2010).

Focalizando nuestro análisis en GADD153, uno de los genes regulados por la proteína BRCA1, determinamos además que BRCA1 aumenta la sensibilidad a la doxorrubicina a través de la regulación transcripcional de este gen (De Luca et al, 2011)

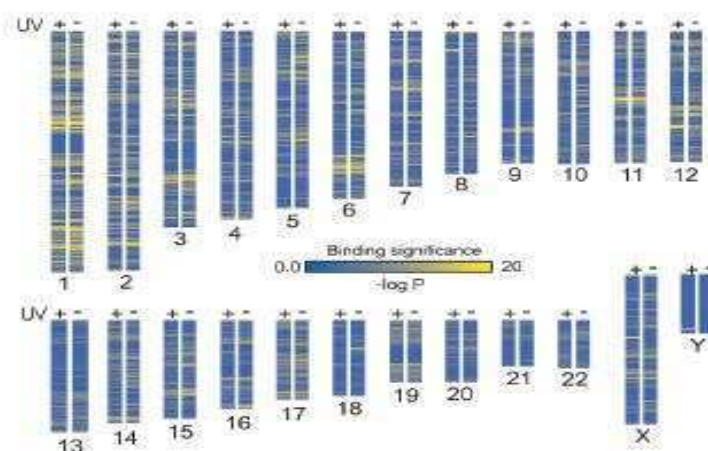


Figura 8. A partir de lisados de células T Jurkat expuestas o no a UV se realizó un ChIP con un anticuerpo anti-BRCA1 o un anticuerpo no específico, como control negativo. El ADN inmunoprecipitado se analizó mediante un microarray de promotores (NimbleGen, Roche) donde se efectuó un mapeo de la región proximal de 37.365 genes ubicados a lo largo de todo el genoma humano. En un primer análisis se seleccionaron aquellos genes que mostraron un enriquecimiento significativo con un $p < 0,000001$. En la figura se muestra mediante un esquema las regiones de asociación de la proteína BRCA1 a todo el genoma humano antes o después de la exposición a UV. Las líneas amarillas indican asociación. Se observa que BRCA1 interacciona con algunos promotores antes y/o después del tratamiento con UV. El gráfico está basado en el promedio de dos experimentos independientes.

Siendo estos los primeros trabajos que demostraron la asociación y la regulación directa de BRCA1 a diversos promotores, pudimos definir el rol central de BRCA1 como orquestador en la respuesta al daño a través de la regulación de diversos grupos de genes (De Luca et al, 2011; De Siervi et al, 2010).

Nº genes con anotación funcional	Categoría funcional (top 45)	Log10(p)
74	Remodelación de la cromatina	-15.6108
211	Respuesta al daño en el ADN	-10.0392
311	Procesamiento en el ARN	-10.0175
617	Ciclo celular	-6.85036
424	Regulación del ciclo celular	-5.03128

Tabla 2. Agrupación de los genes encontrados en el ChIP-chip según su ontología.

Existe una estrecha relación entre los procesos de regulación de la transcripción y la reparación del ADN dañado, en los cuales BRCA1 participa. En esta sección presentamos evidencias que demuestran el rol de BRCA1 como co-regulador de la

transcripción y activador o represor de la expresión de diversos genes. De esta manera, se deduce que BRCA1 podría estar involucrado en diversas funciones celulares debido fundamentalmente a su función reguladora de transcripción. A continuación describiremos la participación y función de BRCA1 en la reparación del ADN.

2.3. Rol de BRCA1 en la reparación del daño en el ADN

Como mencionamos anteriormente, BRCA1 participa de diferentes procesos celulares. La reparación del daño en el ADN y la regulación del ciclo celular son dos mecanismos íntimamente relacionados en los cuales BRCA1 tiene un rol clave. De esta manera, BRCA1 ha sido propuesto como el guardián del genoma, ya que las células que carecen o presentan mutaciones en este gen presentan elevados niveles de aberraciones cromosómicas, aumento de sensibilidad a agentes de daño al ADN y defectos en los puntos del control del ciclo celular. Estos cambios se asocian frecuentemente con pérdidas de proteínas involucradas en la detección y reparación del ADN dañado (Yun & Hiom, 2009).

Existe una gran cantidad de evidencia que apoya el rol de BRCA1 en el proceso de reparación del daño en el ADN. BRCA1 ha sido implicado en el mecanismo de recombinación homóloga (HR). Se ha demostrado además que BRCA1 se asocia con componentes del complejo MRN (MRE11-Rad50-NBS1) siendo reclutado en los sitios de daño en el ADN principalmente del tipo de doble cadena (DSB). Al mismo tiempo ha sido demostrado que las células que carecen de BRCA1 funcional se encuentran altamente perjudicadas en los mecanismos de reparación por HR (Yun & Hiom, 2009).

Más evidencias que apoyan el rol de BRCA1 en la reparación del ADN surgen de estudios con células madre embrionarias de ratón (MES) que presentan un alelo de BRCA1 deletado. En estas células se observaron deficiencias en la reparación del ADN acoplada a la transcripción y en la reparación del ADN doble cadena por el mecanismo de HR e hipersensibilidad a la radiación ionizante y al peróxido de hidrógeno (Gowen et al, 1998; Moynahan et al, 1999). Confirmando estos datos, se reportó que embriones de ratón deficientes en BRCA1 desarrollaban aberraciones cromosómicas (Shen et al, 1998) (Somasundaram, 2003).

Otro hallazgo importante es que los tumores de mama asociados a mutaciones en BRCA1 se caracterizan por un alto grado de aneuploidías, en comparación a aquellos sin mutaciones en este gen (Deng, 2006).

Además, considerando la interrelación entre los procesos de daño en el ADN y la regulación del ciclo celular, se demostró que BRCA1 es necesario para la activación del arresto del ciclo celular tanto en la fase S, como en la transición G2/M posterior al daño en el ADN. Estas funciones están finamente reguladas por la fosforilación de BRCA1 por ATM, una de las quinasas maestras que regula la respuesta celular al daño en el ADN (Xu et al, 2001; Yun & Hiom, 2009). Por último, evidencias estructurales muestran que BRCA1 interacciona con varias fosfoproteínas involucradas en la reparación del ADN dañado a través de los dominios BRCT (Yun & Hiom, 2009).

En este trabajo de tesis, estudiaremos algunos mecanismos moleculares de la respuesta al daño en el ADN en los que intervienen BRCA1 y ATM.

2.4. Maquinaria de respuesta al daño en el ADN

La información genética contenida en el genoma de los organismos se mantiene y transmite de generación en generación mediante la acción de diversos mecanismos que garantizan la integridad del mismo. Existen diferentes tipos de agentes que ocasionan daño en la hebra de ADN, pudiendo ser de origen endógeno, productos del metabolismo celular como radicales libres; o de origen exógeno, como por ejemplo la radiación ionizante (Figura 9). La exposición a estos agentes ocasiona daño en el ADN, provocando mutaciones en la secuencia de la hebra de ADN y rupturas simple o doble cadena del ADN. Estos tipos de daño pueden provocar el arresto del ciclo celular y/o apoptosis (Khanna & Jackson, 2001; van Gent et al, 2001).

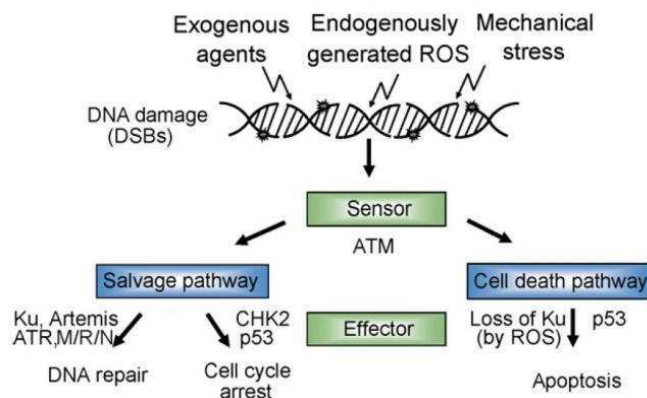


Figura 9. Esquema representativo de los diferentes agentes que pueden ocasionar daño en la hebra de ADN y las vías de señalización (Extraído de Morio & Kim (Morio & Kim, 2008)).

Las células de los organismos presentan una maquinaria específica de reconocimiento y reparación del ADN dañado compuesta por moléculas cada una de ellas con una funcionalidad definida. Este mecanismo conocido como **maquinaria de respuesta al daño en el ADN (DDR, del inglés DNA damage response)** se encarga en primera instancia de identificar y reconocer los sitios de daño en el ADN a través de las *proteínas sensoras* del daño. Estas posteriormente reclutan a las *proteínas que se encargan de transmitir la señal*, gatillando una respuesta de las *proteínas efectoras* (Ver figura 10). De acuerdo a la gravedad del daño sentido las *proteínas efectoras* dispararan señales de arresto del ciclo celular, en caso que el daño pueda ser reparado; o señales de muerte celular, si el daño no puede repararse (Niida & Nakanishi, 2006). En la tabla 3 se mencionan los miembros de cada grupo de proteínas.

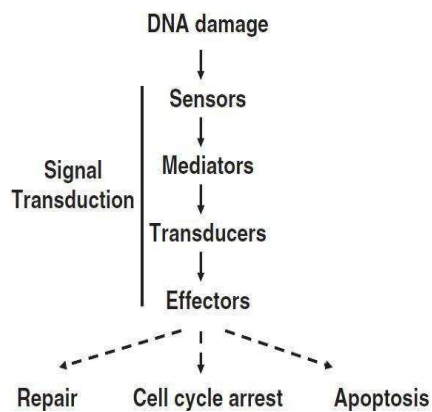


Figura 10. Organización jerárquica de la maquinaria de respuesta y reparación del daño en el ADN. Diagrama de flujo que muestra cada uno de los componentes de la maquinaria y los procesos que se desencadenan por su activación (Extraído de H Niida & M Nakanishi (Niida & Nakanishi, 2006)).

Classification of genes involved in DNA damage checkpoints			
Function	Class	Gene*	
Sensors	RFC1-like	<i>RAD17</i>	
	PCNA-like	<i>RFC2-5</i> <i>RAD9</i> <i>RAD1</i> <i>HUS1</i>	
Mediators	BRCT-containing	<i>BRCA1</i> <i>53BP1</i> <i>TopBP1</i> <i>MDC1</i>	
		DSB recognition/repair (MRN complex)	<i>Mre11</i> <i>RAD50</i> <i>NBS1</i>
		PI3 kinase-like protein	<i>ATR</i> <i>ATM</i>
Transducers	PIKK binding protein Protein kinase	<i>ATRIP</i> <i>CHK1</i> <i>CHK2</i>	
		Effectors	Transcription factor Phosphatase Protein kinase

Tabla 3. Componentes de la maquinaria de reparación del daño en el ADN. Se identifican las proteínas que participan del mecanismo de reconocimiento y reparación del ADN, indicando su función y al grupo al que pertenece (Extraído de H Niida & M Nakanishi (Niida & Nakanishi, 2006)).

2.5. ATM en la respuesta al daño en el ADN

La proteína ATM (Ataxia telangiectasia mutada) es una de las principales responsables de transmitir las señales de daño en el ADN. Dupre y col. determinaron que esta proteína se encuentra asociada a los sitios ADN dañado a partir de los 60 segundos de generado el daño (Dupre et al, 2006). Es por ello que, junto con ATR (ATM related protein), son reconocidas como las principales moléculas responsables en la respuesta al daño en el ADN.

Las mutaciones en los genes ATM o ATR están asociadas con síndromes de inestabilidad genómica. Así, por ejemplo, la patología de ataxia telangiectasia (A-T) se caracteriza por ser una enfermedad autosómica recesiva como consecuencia de mutaciones en el gen de ATM (Savitsky et al, 1995), donde se observa progresiva ataxia debido a la degeneración cortical en el cerebelo; telangiectasia cutánea y ocular; inmunodeficiencia; radiosensibilidad y alta predisposición a desarrollar cáncer (Savitsky et al, 1995).

ATM y ATR pertenecen a la familia de proteínas conocidas como fosfatidil-inositol 3 quinsasas (PI-3K). Estas quinsasas se caracterizan por fosforilar una amplia variedad de proteínas que desencadenan respuestas frente al daño en el ADN. ATM se asocia principalmente con la respuesta frente al daño doble cadena, mientras que ATR con el daño simple cadena de la hebra de ADN. En particular, ATM fosforila sus proteínas blancas en el contexto de los residuos serina o treonina seguido de glutamina en el siguiente motivo (S/T-Q). *In vivo*, ATM se encuentra como un dímero inactivo, el cual se disocia en un monómero activo luego de que se genere DSB en el ADN. Durante este proceso, ATM se auto-fosforila en el residuo de serina 1981 (S1981). Posteriormente ATM fosforila una amplia variedad de moléculas desencadenando cascadas de señalización que conducen al arresto del ciclo celular en las fases G1/S, S y G2/M, a través de la activación de intermediarios como p53 o Chk2. Además ATM también es capaz de fosforilar a la histona H2AX y a BRCA1 (Czornak et al, 2008) (Lavin & Kozlov, 2007) (Poehlmann & Roessner, 2010).

La fosforilación de cada uno de los sustratos de ATM desencadena diferentes tipos de señalización. Por ejemplo, se ha reportado que la fosforilación de H2AX en el residuo S139 señala los sitios de DSB en el ADN, encontrándose focos de esta variante de histona fosforilada en las regiones que rodean los sitios de daño en el ADN (Burma et al, 2001). Este hecho sugiere un rol crítico de H2AX en la transducción de la señal de daño en el ADN (Czornak et al, 2008). Además ha sido reportada una co-localización de focos de fosforilación de H2AX con ATM, BRCA1, el complejo MRN y muchas otras proteínas que participan en la reparación del ADN dañado (Lavin et al, 2005).

De la misma manera, ATM es capaz de fosforilar a BRCA1 en los residuos de serina S1387, S1423 y S1524 en respuesta al daño en el ADN (Gatei et al, 2000). Estas modificaciones post-traduccionales resultan fundamentales para las funciones de BRCA1. Ha sido reportado que mutaciones en los sitios de S1423 y S1524 impiden la capacidad de BRCA1 de regular el punto de control en la transición G2/M del ciclo celular, mientras que si se muta el sitio de S1387, se interrumpe el punto de control de

la fase S (Cortez et al, 1999). Asimismo, la fosforilación de BRCA1 en estos residuos de serina también modifica la actividad de BRCA1 como co-regulador de la transcripción (Cortez et al, 1999).

Los niveles proteicos de ATM no varían significativamente durante el ciclo celular y tampoco se ven afectados luego de que las células son expuestas a la radiación ionizante durante 1 a 24 h (Watters et al, 1997). Además, los niveles de mRNA de ATM se mantienen constantes durante el ciclo celular y la exposición de las células a agentes genotóxicos no modifica los niveles de transcripción de ATM ni tampoco su localización sub-celular (Gately et al, 1998). Estas evidencias muestran que la activación de ATM está gobernada por mecanismos post-traduccionales.

2.6. ATM y riesgo de cáncer

Como mencionamos previamente, las alteraciones en la expresión de oncogenes, de los genes supresores de tumores y de los componentes de la maquinaria de respuesta al daño en el ADN son características claves en la carcinogénesis y en la patogénesis de tumores malignos (Poehlmann & Roessner, 2010). ATM forma parte de la maquinaria que reconoce el ADN dañado y desencadena cascadas de señalización activando mecanismos para reparar estas alteraciones. Es por ello que se realizaron estudios para correlacionar la función de ATM con la predisposición para desarrollar diferentes tipos de cáncer.

Existen evidencias que asocian mutaciones germinales en ATM con un incremento en la predisposición de cáncer. Además, varios trabajos muestran la presencia de mutaciones esporádicas en el gen de ATM en tumores, mayoritariamente del sistema linfático. Otros autores asocian las alteraciones en la señalización de ATM con el riesgo de desarrollar PCa (Poehlmann & Roessner, 2010).

Angele y col. demostraron que existe una asociación entre la expresión de una variante polimórfica de la proteína ATM (3161C > G que corresponde a una modificación en la estructura de la proteína de 1054 P > R) y el aumento del riesgo de desarrollar PCa (Angele et al, 2004).

Fan y col. demostraron que ATM es activa en estadios tempranos de la tumorigénesis prostática y sus niveles van disminuyendo a medida que la lesión progresa desde un PIN hacia un carcinoma (Fan et al, 2006). Otros hallazgos muestran que en lesiones pre-cancerosas de pulmón y de vejiga se observa un incremento en la activación de ATM que disminuye al avanzar la lesión hacia el cáncer (Bartkova et al, 2005; Gorgoulis et al, 2005).

Finalmente, cabe destacar que en los últimos años mucha información se ha recolectado de ensayos en modelos murinos y tumores humanos pudiéndose asociar la pérdida de alelos de genes involucrados en las vías de reparación del ADN como procesos que pueden resultar muy importante en la carcinogénesis. Más aún, ha sido demostrado que la haplo-insuficiencia por ejemplo de BRCA1 o ATM contribuyen en la tumorigenesis (Santarosa & Ashworth, 2004). Asimismo, en su estudio Su y col. demostraron que células hemicigotas para ATM o BRCA1 resultaron ser más sensibles a la transformación celular por radiación y exhibieron una inducción defectuosa de la apoptosis bajo situación de estrés. Las células hemicigotas para ambos genes mostraron efectos negativos aditivos en cuanto a la inducción de la apoptosis y un elevado incremento de la inestabilidad genómica (Su et al, 2010).

2.7. Evidencias previas para el rol de BRCA1 en el PCa

El rol de BRCA1 en la etiología del PCa no se conoce claramente. Existen evidencias de que mutaciones germinales en el gen BRCA1 no solo aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario, sino que incrementan el riesgo relativo (1,8 veces) de desarrollar PCa en sus portadores (Sundararajan et al, 2011). Estas asociaciones se ven influenciadas por la baja incidencia de estas mutaciones en la población en general (0,07 % y 0,24 %) en diferentes estudios (Castro & Eeles, 2012).

Los primeros estudios epidemiológicos que intentaron esclarecer el rol de mutaciones en BRCA1 se efectuaron en la población étnica de judíos Ashkenazi, ya que el 2 % de esta población presenta al menos una de las tres mutaciones fundadoras en este gen (185delAG, 5382insC y 6174delT). Estos estudios demostraron que, si bien las mutaciones en BRCA1 no se asocian con el riesgo elevado de contraer PCa, las mismas aumentan la agresividad de la enfermedad. Así por ejemplo, en un estudio analizando 2.486 pacientes, Agalliu y col. demostraron que los pacientes con la mutación fundadora 185delAG presentan una predisposición 3,5 veces mayor de desarrollar tumores más agresivos con un grado de *Gleason* alto, con respecto a los pacientes que no presentan esta mutación (Agalliu et al, 2009). Además en este estudio se demostró que los familiares hombres de pacientes con cáncer de mama y ovario que presentan la mutación 185delAG en BRCA1 tienen un mayor riesgo de desarrollar PCa (Agalliu et al, 2009).

Otro estudio realizado con alrededor de 1.286 hombres demostró que los pacientes con mutaciones en el gen BRCA1 presentan mayor riesgo de recurrencia bioquímica (4,3 veces) y de muerte específica por PCa (5,2 veces) (Gallagher et al, 2010).

Por otra parte, si bien las mutaciones en BRCA1 no se asocian a un incremento en el riesgo de PCa en la población general, un estudio realizado a partir de 11.843 casos de 699 familias con mutaciones en BRCA1 recolectados a partir de 30 centros de Europa y América del Norte determinó que los portadores de mutaciones de BRCA1 menores de 65 años de edad presentan un moderado aumento del riesgo de desarrollar PCa (Thompson & Easton, 2002). Sin embargo Agalliu y col. demostraron también que los pacientes con la mutación 185delAG presentan mayor riesgo de padecer PCa por encima de los 65 años (Agalliu et al, 2009).

Todos los estudios anteriormente presentados coinciden en que los portadores de las mutaciones germinales en el gen BRCA1 presentan una mayor incidencia de tumores poco diferenciados con tamaños mayores y una alta incidencia de formación de metástasis distantes y se caracterizan por una mayor agresividad (Castro & Eeles, 2012).

Una de las características más interesantes de BRCA1 que sugiere que podría tener un rol importante en el desarrollo y progresión del PCa, es su capacidad de asociación con el AR (Park et al, 2000; Yeh et al, 2000). Se observó que BRCA1 interacciona directamente con el dominio AF-1 de la proteína AR induciendo su actividad transcripcional (Park et al, 2000), El efecto estimulador de BRCA1 sobre la actividad transcripcional de AR además está influenciada por co-reguladores transcripcionales, tales como CBP, GRIP1, ARA55 y ARA70 (Yeh et al, 2000).

Finalmente, se encontró que BRCA1 regula la transcripción del receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-IR), que es un factor clave en la iniciación y progresión del PCa (Schayek et al, 2009). Schayek y col. determinaron que esta regulación es dependiente de la expresión de AR, ya que en las células que no expresan este receptor, la sobre-expresión de BRCA1 reprimió un 50% los niveles de expresión de IGF-IR. En cambio, en células de PCa que expresan AR *wild type*, BRCA1 induce la expresión de IGF-IR estimulando la actividad transcripcional de AR (Schayek et al, 2009).

En síntesis, todas estas evidencias indican que BRCA1 posee un rol en el desarrollo y progresión del PCa. En este trabajo de tesis aportaremos nuevas evidencias para esclarecer la función de la vía de señalización de BRCA1 con esta patología.

CAPITULO III

***Rol de BRCA1 y CtBP1 en el
metabolismo de la célula tumoral***

3.1. Metabolismo y cáncer

Los cambios en el metabolismo celular son una característica común de los tejidos tumorales y se la considera una de las características claves del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Numerosos mecanismos moleculares se ven afectados en las células tumorales por factores intrínsecos y extrínsecos. Estos mecanismos alteran las vías principales del metabolismo celular activando los tres pilares básicos necesarios para las células en división: la generación rápida de ATP, de manera de mantener el estatus energético; el incremento en la biosíntesis de macromoléculas; y un mantenimiento equilibrado o apropiado del estado redox celular (Figura 11) (Cairns et al, 2011). Estos fenómenos garantizan la proliferación y posterior diseminación de las células tumorales.

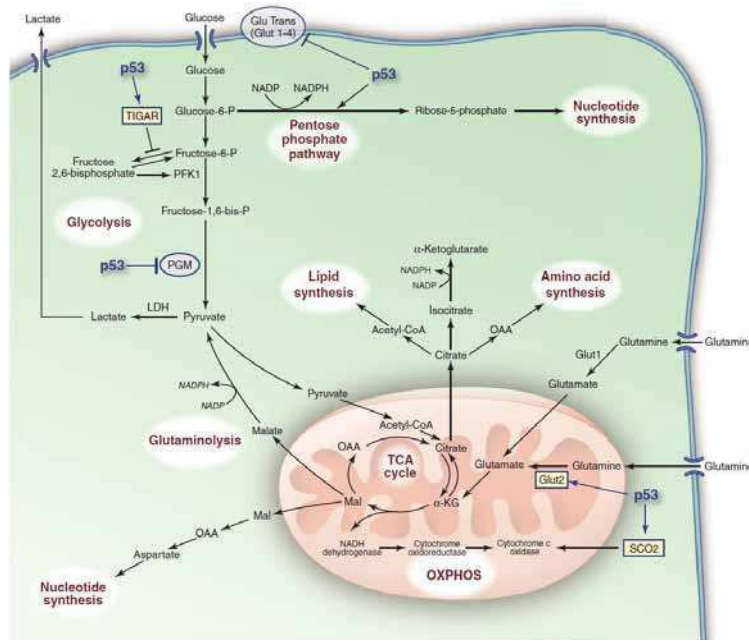


Figura 11. Se muestran las vías principales del metabolismo celular en células en división, incluyendo glucólisis, producción de lactato, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), fosforilación oxidativa y biosíntesis de nucleótidos, lípidos y aminoácidos. En las células tumorales las alteraciones de diversos oncogenes y genes supresores de tumores conducen a alteraciones en estas vías. Se muestra la regulación de p53 sobre algunos genes claves que promueve la utilización de una vía u otra según los requerimientos de la célula (Extraído de Levine y col. (Levine & Puzio-Kuter, 2010)).

La asociación entre el cáncer y las alteraciones en el metabolismo celular es bastante antigua. El fenotipo metabólico mejor caracterizado en las células tumorales, conocido como *efecto Warburg*, fue descrito por el fisiólogo y premio nobel Otto Heinrich Warburg en la década de 1920. Las observaciones de Warburg describen que las células tumorales metabolizan la glucosa de manera diferente a las células normales (Warburg, 1956a). Las células cancerosas tienden a fermentar la glucosa a lactato a pesar que el oxígeno esté presente y puedan realizar la fosforilación oxidativa

mitocondrial. Es decir, utilizan la vía de la glucólisis como el mecanismo principal para la generación de ATP, aún en condiciones de normoxia. Las células normales, sin embargo utilizan la glucólisis sólo en condiciones donde el oxígeno es escaso y requieren rápida generación de ATP, como ocurre por ejemplo durante el esfuerzo físico en las fibras musculares; las células cancerosas en cambio, optan por este mecanismo de generación de ATP en todo momento por lo que se lo conoce como glucólisis aeróbica (Warburg, 1956b).

Esta alteración en la manera de generar ATP en la célula trae aparejado una serie de cambios a nivel molecular que le permiten satisfacer las demandas energéticas utilizando un mecanismo menos eficiente en la transformación de una molécula de glucosa a energía en forma de ATP, pero a una mayor velocidad (Cairns et al, 2011; Levine & Puzio-Kuter, 2010).

Como producto de la activación persistente de la glucólisis, la célula cancerosa produce altas concentraciones de NADH. Esta molécula, clásicamente asociada con el potencial redox de la célula, actúa como co-enzima en varias reacciones redox, pudiendo encontrarse en su estado oxidado NAD⁺ o reducido NADH (Ghosh et al, 2010). Los niveles de NAD⁺ intracelular exceden ampliamente a los de NADH en una relación de 700:1 (Williamson et al, 1967) y esto puede verse afectado por varios factores. Uno de ellos es una alta tasa proliferativa de las células que, para afrontar el gasto energético que genera la división celular, eleva la respiración oxidativa incrementándose la relación de NAD⁺/NADH por el consumo de NADH. Por otro lado, una alta ingesta calórica, eleva los niveles de NADH, disminuyendo la razón entre NAD⁺/NADH al igual que ocurre en condiciones de hipoxia, otro factor que influye en la relación entre ambas moléculas.

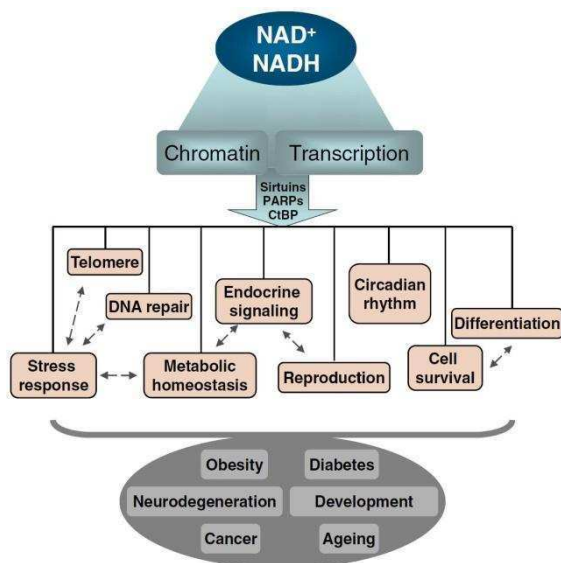


Figura 12. Rol de NAD⁺/NADH en la fisiología celular. Estas moléculas participan de procesos que regulan la remodelación de la cromatina y la transcripción a través de su asociación con las proteínas CtBP1, SIRT1 y PPARs. De esta manera modulan procesos muy importantes en el mantenimiento normal de la fisiología celular. Cualquier perturbación del sistema, puede llevar a las diferentes patologías mencionadas. (Extraído de Sanchari Ghosh y col. (Ghosh et al, 2010)).

La molécula de NAD⁺/NADH también ha sido implicada en la regulación de factores celulares claves involucrados en procesos de reparación del ADN, progresión del ciclo celular y transcripción entre otros, al asociarse con diversos factores tales como las proteínas CtBP y Sirtuinas (Sirt) (Ghosh et al, 2010). (Figura 12)

Por otro lado, numerosos estudios epidemiológicos indican que el sobrepeso y la obesidad, reflejado como el elevado índice de masa corporal (BMI), correlacionan con la mortalidad y la recurrencia bioquímica del PCa (Cao & Ma, 2011). Sin embargo, todavía no se conoce el mecanismo molecular por el cual la obesidad activa las vías de transformación que resultan en el cáncer.

En resumen, la alta ingesta calórica y las condiciones de hipoxia generan altas concentraciones de NADH que incrementan la actividad de proteínas tales como las de la familia de CtBP. El consumo de dietas con alto contenido graso, el sobrepeso y/o la obesidad aumentan el riesgo y la agresividad del PCa. A continuación describiremos las funciones moleculares de CtBP1 ya que en este trabajo de tesis realizaremos estudios involucrando dicha proteína.

3.2. CtBP1

CtBP (C-terminal binding protein) es una familia de proteínas que funciona como co-regulador de la transcripción cooperando con factores de transcripción en la modulación de la expresión de los genes blancos. Esta familia de proteínas está altamente conservada en distintos organismos desde *c. elegans* hasta mamíferos, y en estos últimos se identificaron 2 miembros: CtBP1 y CtBP2 (Jack et al, 2011). Estas son proteínas co-represoras de la transcripción, ya que reclutan enzimas modificadoras de histonas silenciando la expresión de ciertos genes. Estructuralmente, estas proteínas poseen un dominio funcional en el extremo *N-terminal* que le permite el reconocimiento y la unión a factores o co-reguladores de la transcripción que presentan el motivo PXDLS (Pro-X-Asp-Leu-Ser) (Jack et al, 2011). El extremo *C-terminal* presenta un dominio con alta homología al grupo de enzimas deshidrogenasas (D2-hydroxy acid) (Figura 13). Este dominio le permite interactuar con ambas formas de la molécula de nicotinamida dinucleótido, NAD⁺ y NADH (Kumar et al, 2002), aunque presenta mayor afinidad (> 100 veces) por NADH que por NAD⁺ (Fjeld et al, 2003). La interacción con dichas moléculas promueve su dimerización a través de esta misma región con otro monómero de CtBP, pudiendo así homo- o hetero-dimerizar (Chinnadurai, 2009).

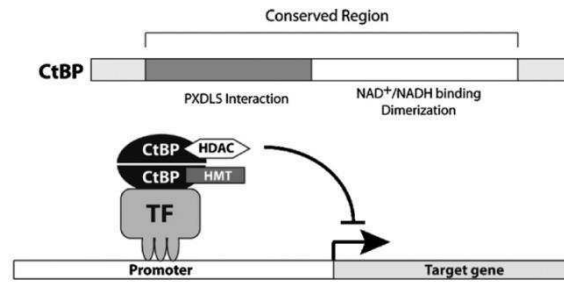


Figura 13. Esquema representativo de la estructura de la proteína CtBP identificando sus dominios funcionales y el mecanismo de acción como co-represor de la transcripción (Extraído de B.H.A. Jack y col. (Jack et al, 2011)).

CtBP1 y 2 muestran un patrón de expresión ubicuo y en ocasiones superpuestos denotando un cierto grado de redundancia en sus funciones. Sin embargo, ensayos de ratones *knock out* para cada uno de estos genes mostró que el bloqueo de la expresión de CtBP1 genera individuos fértiles y viables pero de menor tamaño que los de tipo salvaje; mientras que los animales nulos para CtBP2 no sobreviven al día 10.5 embrionario mostrando defectos a nivel axial, neuronal y cardíacos (Jack et al, 2011).

CtBP1 fue el primer miembro identificado de la familia, descubierto mediante una búsqueda de factores celulares capaces de unir o modular la actividad de la proteína oncogénica adenoviral E1A (Schaeper et al, 1995). A partir de su función como co-represor de la transcripción y la capacidad para unir NAD⁺/NADH, se establecieron varias funciones de esta proteínas.

La función más estudiada de CtBP1 es la represión de genes a través de la interacción con un amplio número de factores de transcripción (Chinnadurai, 2009). Por ejemplo, se determinó que reprime la expresión de e-caderina (Pena et al, 2006) participando de la regulación de la transición epitelio-mesenquimal (EMT), un paso fundamental que contribuye a las propiedades malignas de las células tumorales debido a la pérdida de moléculas de adhesión, adquisición de motilidad, fenotipo invasivo y resistencia a la apoptosis (Thiery, 2002). De la misma manera participa en procesos que antagonizan con la respuesta de apoptosis al reprimir genes pro-apoptóticos. Además, actúa como represor de diversos genes supresores tumorales, tales como PTEN (Grootclaes et al, 2003), el ya mencionado e-caderina y, recientemente, fue identificado a BRCA1 como blanco de su regulación (Di et al, 2010).

Por otro lado, dada su capacidad para unir NAD⁺/NADH, CtBP1 ha sido postulado como un sensor metabólico del estado nutricional de la célula. Como mencionamos previamente, los niveles de NAD⁺/NADH varían con la ingesta, alterando la relación entre ambos. Los niveles de NAD⁺ libre en la célula exceden ampliamente a los de

NADH, por lo que la conversión de NAD⁺ a NADH ocasiona cambios relativamente mayores en los niveles del pool de NADH libre (Zhang et al, 2002). Considerando la capacidad de CtBP1 para unir con mayor afinidad NADH, esta proteína estaría generando un mecanismo de sensado sumamente sensible del estado metabólico celular y además es capaz de acoplar tales variaciones en el estado metabólico con procesos de regulación de la transcripción (Fjeld et al, 2003). Por lo tanto, en este contexto el estado metabólico celular actúa como factor regulador de la expresión de ciertos genes (Ghosh et al, 2010).

En base a este mecanismo distintivo que posee CtBP1 para regular la transcripción de otros genes, consideramos que es de vital importancia comprender los mecanismos de este tipo de regulación y en particular identificar aquellos blancos de trascendental injerencia en la homeostasis de las células.

3.3. Regulación de la transcripción de BRCA1

BRCA1 juega un rol fundamental para mantener la homeostasis celular, no solo porque participa de la maquinaria que interviene en la reparación del ADN, sino porque también ha sido implicada en la co-regulación de la transcripción de numerosos genes que tienen como fin evitar la transformación de células que pueden adquirir características tumorales. Es por ello, que resulta de vital importancia comprender los factores que regulan su expresión, así como también entender las vías y procesos que modula en las células tumorales.

Numerosos estímulos regulan la transcripción de BRCA1, como por ejemplo ciertos agentes genotóxicos, hormonas mitogénicas y la hipoxia (Andres et al, 1998; Bindra et al, 2005; Gudas et al, 1995). En las células de cáncer de mama por ejemplo, el tratamiento con doxorubicina (inhibidor de la topoisomerasa II), camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I) o radiación UV reprimen la expresión de BRCA1 (Andres et al, 1998). Sin embargo, esta represión provocada por agentes genotóxicos depende de la presencia y actividad de la proteína p53, ya que se observó que en células transfectadas con dominantes negativos de p53 esto no ocurre (Andres et al, 1998). Asimismo, nuestros hallazgos utilizando líneas celulares tumorales deficientes en p53 muestran que los agentes genotóxicos inducen la transcripción de BRCA1 (De Siervi et al, 2010).

Se demostró además que la hipoxia disminuye la expresión de BRCA1 lo cual aumenta la inestabilidad genómica, siendo este fenómeno asociado a un bloqueo en los mecanismos de recombinación homóloga dirigidos por BRCA1 (Bindra et al, 2005).

Considerando que las alteraciones en la expresión y mutaciones en BRCA1 se asocian a un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama; que las hormonas sexuales femeninas juegan un rol esencial en esta patología y fundamentalmente debido a que BRCA1 interacciona con el ER, varios grupos de trabajo estudiaron la regulación del promotor de BRCA1 por estrógenos y progesterona. Se determinó así que la estimulación con estrógenos induce la expresión de BRCA1 en células de cáncer de mama (Di et al, 2010; Gudas et al, 1995). Sin embargo, el mecanismo involucrado en esta inducción no se ha esclarecido completamente.

El promotor de BRCA1 no contiene secuencias consenso TATA box y experimentos de delección y mutagénesis demostraron la funcionalidad de numerosas secuencias consenso a lo largo de este promotor, como por ejemplo motivos para Sp1, para elementos de respuesta a cAMP (secuencias CREB) y para el receptor de estrógenos (ERE) (Bindra & Glazer, 2006). Además se observó que algunas secuencias distales del promotor de BRCA1 son importantes para la regulación positiva o negativa de su transcripción, si bien todavía se desconoce los factores de transcripción que se asocian a estas regiones (Bindra & Glazer, 2006).

Varios estudios demostraron además que los miembros de la familia E2F/Rb regulan la expresión de BRCA1. Como mencionamos previamente, nuestro grupo demostró que BRCA1 regula su propia expresión a través de un mecanismo que involucra la formación de un complejo con las proteínas E2F1 y Rb. BRCA1 se asocia a su promotor y en conjunto con estas proteínas reprime su expresión. Por otro lado, hemos demostrado que en presencia de daño al ADN, BRCA1 se libera de su promotor activando su transcripción (De Siervi et al, 2010).

Finalmente, nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Dr. Kevin Gardner (NCI–NIH) estableció un mecanismo molecular que involucran el aumento de la concentración de NADH intracelular y los estrógenos con la regulación transcripcional de BRCA1 (Di et al, 2010). En este trabajo se demostró que en ausencia de estrógenos, BRCA1 es reprimido por un complejo multi-proteico que incluye a las proteínas CtBP1, p130, BRCA1, HDAC1, CtIP, E2F1, E2F4, Rb y p300 (Di et al, 2010). En cambio, en presencia de estrógenos, disminuye la asociación de estas proteínas al promotor de BRCA1, con la consiguiente unión de histona 3 y 4 acetiladas en este promotor y la activación de su transcripción (Di et al, 2010).

La asociación de CtBP1 al promotor de BRCA1 no había sido descrita previamente e implica un nuevo tipo de regulación para este gen donde, además de la estimulación por estrógenos, un incremento en la relación NAD⁺/NADH inducen la liberación de CtBP1 del promotor de BRCA1, aumentando su expresión. Por lo tanto, la ingesta calórica sería un posible nuevo estímulo regulatorio de los niveles de BRCA1.

En resumen, el entendimiento de los factores que regulan la expresión de BRCA1 es crucial para entender los mecanismos por los cuales BRCA1 se encuentra reprimido en los tumores, así como también para el esclarecimiento de las funciones celulares en los que esta proteína está involucrada.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente proyecto se basa en la siguiente hipótesis: **el estudio de la regulación de las vías moleculares específicas del PCa que involucran a la proteína BRCA1 nos permitirá identificar nuevos marcadores para el diagnóstico, el seguimiento y la terapia contra esta enfermedad.**

En base a esto, **el objetivo general de este proyecto es identificar el rol de BRCA1 en las vías moleculares del desarrollo tumoral prostático.**

Objetivos específicos.

- 1. Investigar el rol de BRCA1 en la regulación de la transcripción de genes involucrados en la respuesta al daño en el ADN en el PCa.**

Base racional: La inestabilidad genómica es una característica clave en la carcinogénesis y patogénesis de numerosos tumores malignos. BRCA1 actúa como co-regulador de la transcripción de un amplio espectro de genes que participan en diversos procesos celulares, entre ellos la respuesta al daño en el ADN. Dado que ATM es una de las principales proteínas en orquestar esta respuesta, nos proponemos investigar el rol de BRCA1 en la regulación transcripcional de ATM y su respuesta frente al estrés genotóxico en células de PCa.

- 2. Investigar el efecto de hormonas (andrógenos y estrógenos) sobre la regulación transcripcional de BRCA1 en células de PCa.**

Base racional: El PCa es una enfermedad multifactorial, donde tanto las vías de señalización por andrógenos como por estrógenos están asociadas con el desarrollo y progresión de esta enfermedad. Ha sido reportado en cáncer de mama que la transcripción de BRCA1 es regulada por estrógenos. Nuestro objetivo es estudiar la regulación transcripcional de BRCA1 por estas hormonas en el PCa y como esta regulación afecta el desarrollo de la enfermedad.

- 3. Estudiar la influencia de la dieta hipercalórica (similar a una baja relación NAD⁺/NADH) sobre el desarrollo tumoral de próstata.**

Base racional: La obesidad y los síndromes metabólicos se asocian con el desarrollo tumoral prostático. Los niveles celulares de la relación NAD⁺/NADH varían en presencia de alta energía, similar a una dieta hipercalórica. CtBP1 es un represor transcripcional de BRCA1 y se activa en presencia de altas concentraciones de NADH. Nos proponemos determinar si el aumento de la actividad de CtBP1 en tejido

prostático que surge de la baja relación $NAD^+/NADH$, resultante de una dieta hipercalórica u obesidad, contribuyen a aumentar el desarrollo de PCa a través de la regulación transcripcional del gen BRCA1.

MATERIALES y MÉTODOS

CAPITULO I

***Líneas celulares, tratamientos,
reactivos y plásmidos***

1.1. Condiciones de crecimiento de las líneas celulares.

Las líneas celulares de PCa PC3, LNCaP, C4-2 y 22Rv1 y sus clones derivados por transfección estable, se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con L-glutamina, 0,2% m/V de bicarbonato de sodio, 10% suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,5 µg/ml de anfotericina) en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda de CO₂ 5%. La línea celular NIH 3T3 se cultivó utilizando medio D-MEN (Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternero (Hyclone) y en las mismas condiciones que las anteriormente mencionadas.

En el caso de las líneas celulares derivadas por transfección estable, las mismas se crecieron en medio de cultivo suplementado con geneticina (G418 – Sigma Aldrich) o puromicina (Sigma Aldrich) según se indique. Las células fueron suplementadas con una dosis de antibiótico de selección durante la generación de las líneas celulares y durante una semana cada vez que fueron descongeladas. Transcurrido ese período, las células se mantuvieron con una dosis de mantenimiento de G418 o puromicina según corresponda.

1.2. Mantenimiento de las líneas celulares.

Las líneas celulares adherentes (PC3 y sus derivadas de expresión de moléculas estables, LNCaP, 22RV1, C4-2 y NIH 3T3) se crecieron en placas de 100 mm de diámetro con 5 ml de medio de cultivo. Cuando los cultivos alcanzaron un 90% de confluencia se repicaron realizando dos lavados con 5 ml de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 10,1 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM pH = 7,4) y una incubación con 1 ml de tripsina (0,25% en PBS) durante 1-3 min en estufa a 37°C y CO₂ 5%. El efecto de la tripsina se interrumpió por dilución con medio de cultivo.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo para realizar experimentos entre los pasajes 20 y 50.

Las líneas celulares se preservaron en criotubos de reserva en nitrógeno líquido generados a partir de aproximadamente 3x10⁶ células en un 1 ml de SFB suplementado con 7% de dimetilsulfóxido (DMSO). Cada vez que fue necesario, los criotubos se descongelaron de manera rápida por incubación en baño a 37°C transfiriéndolas al medio de cultivo previo lavado para eliminar el DMSO.

1.3. Generación de líneas celulares estables.

Antes de generar las líneas celulares estables se determinaron las dosis de selección y mantenimiento de G418 (geneticina) y puromicina óptima para cada línea celular. La dosis de mantenimiento de los antibióticos se definió como la mínima concentración de antibiótico necesaria para eliminar el 100% de las células de tipo salvaje (no transfectadas), y fue de 100 µg/ml para G418, en el caso de las células PC3 y de 1 µg/ml para puromicina. La dosis de selección fue el doble de la dosis de mantenimiento en ambos casos.

Las líneas celulares PC3 pcDNA3 BRCA1 que sobre-expresa BRCA1 y PC3 shRNA BRCA1 que tiene disminuída la expresión de BRCA1 y sus controles (pcDNA3 y shRNA scramble) fueron previamente generadas y se describen en (De Siervi et al, 2010).

La línea celular PC3 pcDNA3 CtBP1 que sobre-expresa CtBP1, se generó por transfección utilizando 5 µl del reactivo comercial Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con 15 µg del plásmido pcDNA3 CtBP1.

Para la transfección por el método de lipofectamina, las células PC3 se crecieron en placas de 60 mm de diámetro hasta un 70 % de confluencia. Las cantidades indicadas de los plásmidos, en 50 µl de medio RPMI 1640 sin antibióticos ni SFB, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. En paralelo, 5 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) se incubaron en 50 µl de medio RPMI sin antibióticos ni SFB durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se mezclaron ambas soluciones e incubaron 20 min a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS y se les agregó 700 µl de RPMI 1640 sin antibióticos ni SFB. Los 100 µl de la mezcla plásmido/Lipofectamine 2000 fueron añadidos gota a gota a las células que fueron incubadas 5 h en estufa a 37°C con 5 % de CO₂. Finalmente, se reemplazó el medio de incubación con 5 ml de medio fresco RPMI 1640 con SFB 10% y antibióticos y Luego de 24 h post-transfección, se agregó G418 como antibiótico de selección y al cabo de 10 días, se aislaron clones individuales por tripsinización.

Para el caso de las células donde la expresión de CtBP1 se encuentra silenciada (shRNA CtBP1), se utilizaron vectores lentivirales en células HEK293LTV para luego transducir células PC3. Para el empaquetamiento lentiviral, las células HEK293LTV se transfectaron por el método de Lipofectamina. Para ello, 3,64 µg de pSPAX2, 1,45 µg de pMD2G y 4,86 µg de shRNA CtBP1 (sc-35122-SH, Santa Cruz Biotechnology Inc.), conteniendo una mezcla de 3 secuencias shRNA CtBP1, o 4,86 µg de pGIPZ como control se mezclaron en 1,5 ml de medio RPMI 1640 sin antibióticos ni SFB y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, 60 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) se incubaron en 1,5 ml de medio RPMI 1640 sin

antibióticos ni SFB durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se combinaron ambas soluciones y se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Las células HEK293LTV crecidas en placas de 100 mm de diámetro hasta un 90% de confluencia se lavaron dos veces con PBS y se les agregó 7 ml de RPMI 1640 sin antibióticos suplementado con 2% de SFB. Los 3 ml de la mezcla plásmido/Lipofectamine 2000 se añadieron gota a gota a las células que se incubaron 5 h en estufa a 37°C con CO₂ 5%. Luego el medio de cultivo se reemplazó por 10 ml de RPMI 1640 con 10% de SFB y antibióticos.

El sobrenadante viral se colectó cada 24 h tres veces consecutivas. Finalmente, se transdujeron las células PC3 previamente crecidas en placas de petri (100 mm) en un 90% de confluencia, con los sobrenadantes lentivirales filtrados y suplementados con 8 µg/ml de polybrene (Millipore) cada 24 h por tres rondas consecutivas. Al cabo de 24h de la última ronda de transducción se agregó puromicina al medio de cultivo para seleccionar los clones celulares. Luego de 10 días de selección con una dosis de 2 µg/ml 72 h las células se cosecharon para extracción de proteínas totales o RNA.

Se analizaron los niveles de expresión de CtBP1 en todas las líneas celulares generadas, tanto a nivel proteico como a nivel de ARN mensajero, ya sea por Western blot (WB) o mediante RT-qPCR (transcripción reversa acoplada a PCR en tiempo real), respectivamente.

1.4. Tratamiento de células con agentes quimioterapéuticos.

La doxorrubicina (Laboratorios Rontag) se reconstituyó con DMSO a una concentración 100 mM. La solución de etopósido (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml fue gentilmente cedida por el Dr. Eduardo Cánepa (FCEN, UBA). La mitoxantrona (Micraleve®, Ivax Argentina) se utilizó a una concentración final de 1 µM, y el metotrexato (Ervemin®, Ivax Argentina) a concentración final de 200 µM. Para tratar a las células, cada solución stock se diluyó con DMSO hasta llegar a una concentración 1000X con respecto a la concentración final requerida en cada experimento luego se diluyó con medio de cultivo a la concentración deseada (dilución 1:1000). De esta manera las células se incubaron con distintas dosis de estas drogas quimioterapéuticas a diferentes tiempos como se indica para cada experimento.

Para el control las células se incubaron con DMSO diluído (1:1000) en medio de cultivo.

1.5. Tratamiento de células con otros agentes.

Para el tratamiento con testosterona, las líneas celulares PC3 y LNCaP, se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo fenol (Invitrogen) con el agregado de SFB depletado de hormonas (charcolizado, SFBch) o con el agregado de andrógenos (Undecanoato de testosterona, Shering). Brevemente, se charcolizó el SFB para depletarlo de hormonas según describió (Lippman et al, 2005); 5 ml de una solución de carbono dextrano 10X (1,25g de carbón activado, Merck; 0,125g de dextrano, GE; 0,01M Tris en 50 ml, ph 7,4) se centrifugó a 12000 rpm por 10 min (Sorvall SS-34). Se descartó el sobrenadante y el pellet se diluyó en 50 ml de SFB. La mezcla se incubó 30 min a 56°C y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se mezcló nuevamente con otro pellet de una solución carbonodextrano 10X y se repitió el procedimiento anterior. Finalmente el sobrenadante se lo esterilizó por filtración (0,2 µm). Se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización. El tratamiento con andrógenos consistió en la administración de Testosterona (Undecanoato de testosterona, Shering) por 24 a 48 h posterior a la incubación por 24 h de las células en medio de cultivo con SFBch. La solución stock de testosterona (547,4 mM) se diluyó en DMSO a una concentración de 10 mM y a continuación una segunda dilución en medio de cultivo a una concentración de 1000X para administrar a las células. Las concentraciones utilizadas se indican en cada experimento y se encuentran en el rango de los 10 nM a 10 µM.

El letrozole (Femara®, Novartis), inhibidor de la enzima aromatasa que produce la aromatización de testosterona en estradiol, se preparó en una solución stock de 200 µM en Etanol. Luego, se diluyó en RPMI 1640 sin rojo fenol y se les administró a las células a una concentración final de 5 µM durante 24 h.

El inhibidor de actividad quinasa de ATM KU 55933 [2-(4-Morpholinyl)-6-(1-thianthrenyl)-4H-pyran-4-one, Tocris Bioscience] gentilmente cedido por el Dr. Eduardo Cánepa, se preparó en DMSO y se lo utilizó a una concentración final de 10 µM por 24 h con un pre-tratamiento de 1 h.

La administración de Actinomicina D (Invitrogen), agente inhibidor de la transcripción, gentilmente cedida por el Dr. Omar Coso, se preparó en DMSO y se la utilizó a una concentración final de 5 µg/ml con un período de 1 h de pre-tratamiento seguido de la incubación de 6 a 24 h, según se indique.

1.6. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados se describen a continuación:

- **pGL3 Basic:** es un plásmido que contiene el gen de la luciferasa y río arriba la región de clonado con varios sitios de corte para enzimas de restricción (Figura 14).

Dicho plásmido fue cedido gentilmente por Dr. Kevin Gardner (NCI, NIH, Bethesda, EE.UU.).

- **pGL12:** es un plásmido reportero (pGL3 Basic) con 270 pb del promotor de BRCA1 clonado río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen de la luciferasa, cedido gentilmente por el Dr. Kevin Gardner (NCI, NIH, Bethesda, EE.UU.) (Xu et al, 1997).

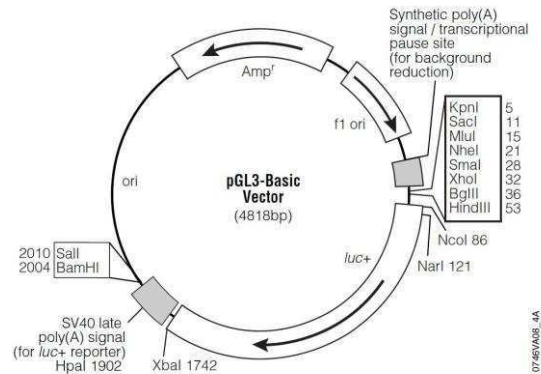


Figura 14. Mapa del plásmido pGL3-Basic indicando el cDNA que codifica para la luciferasa de luciérnaga (*luc+*); la resistencia para ampicilina (*Amp^r*); el origen de replicación para *E. coli* (*ori*); y el origen de replicación para bacteriófagos.

- **ATM-Luc:** es un plásmido reportero que contiene 1000 pb del promotor de ATM río arriba del TSS del gen de la luciferasa (Switch gear, EE.UU)

- **pcDNA3** (Invitrogen): plásmido de expresión de células eucariotas que contiene un promotor fuerte (pCMV) y un sitio de clonado con varias regiones de corte para diferentes enzimas de restricción, además de presentar resistencia a antibióticos para su selección en bacterias y en células eucariotas (Figura 15).

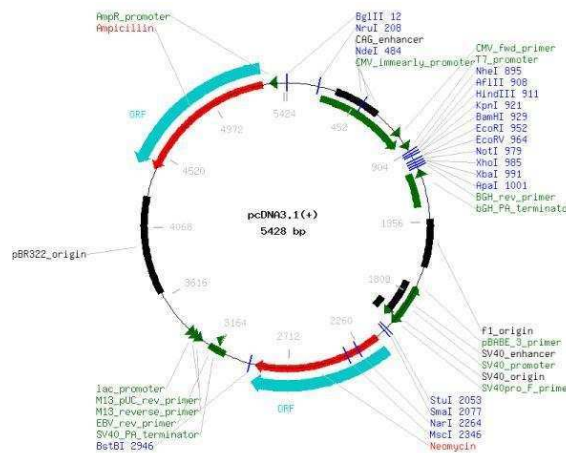


Figura 15. Mapa del plásmido pcDNA 3.1 indicando el sitio de múltiple clonado; el promotor de citomegalovirus (pCMV); la resistencia para ampicilina (Ampicilin) y para neomicina (Neomycin); el origen de replicación para *E. coli* (pUC ori); y el origen de replicación para bacteriófagos (f1 ori).

- **pcDNA3 BRCA1 wt:** es un plásmido de expresión pcDNA3 donde fue clonado el ADNc (ADN copia) completo de BRCA1 *wild type*. Dicho plásmido fue cedido gentilmente por Dr. Kevin Gardner (NCI, NIH, Bethesda, EE.UU.) (Aprelikova et al, 1999).
- **pcDNA3 BRCA1 ΔBRCT:** plásmido de expresión para BRCA1 que contiene delecionado en el extremo C-terminal los dominios BRCT. Dicho plásmido fue cedido gentilmente por Dr. Kevin Gardner (NCI, NIH, Bethesda, EE.UU.).
- **pcDNA3 E2F1:** Es un plásmido de expresión pcDNA3 para el ADNc de E2F1 wt que fue gentilmente cedido por el Dr. Doron Ginsberg (Jiao et al, 2005).
- **pcDNA3 E2F1 (E132):** Es un plásmido de expresión para el ADNc de E2F1 dominante negativo que contiene una mutación que anula el sitio de unión al ADN de E2F1. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Doron Ginsberg (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) (Jiao et al, 2005).
- **pcDNA3 E2F1 Δ(1-363):** Es un plásmido de expresión para el ADNc de E2F1 dominante negativo que posee delecionado el sitio de transactivación entre los aminoácidos 1 al 363. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Doron Ginsberg (Jiao et al, 2005).
- **pcDNA3 CtIP:** Es un plásmido de expresión pcDNA3 que contiene clonado el ADNc de CtIP (C-terminal interacting protein) wt. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Ju Ming Wang (Institute of Bioinformatics and Biosignal transduction NCKU, Taiwan).
- **pcDNA3 CtIP DC:** Es un plásmido de expresión pcDNA3 que contiene clonado el ADNc de CtIP que presenta una mutación puntual que evita la interacción de esta proteína con la proteína CtBP1. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Ju Ming Wang (Institute of Bioinformatics and Biosignal transduction NCKU, Taiwan).
- **pcDNA3 CtIP EK:** Es un plásmido de expresión pcDNA3 que contiene clonado el ADNc de CtIP que presenta una mutación puntual que evita la interacción de esta proteína con la proteína Rb. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Ju Ming Wang (Institute of Bioinformatics and Biosignal transduction NCKU, Taiwan).
- **pcDNA3 CtBP1:** Es un plásmido de expresión pcDNA3 que contiene clonado el ADNc de CtBP1 (c-terminal binding protein 1). El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Richard H. Goodman (Vollum Institute, Oregon Health & Sciences University Portland).
- **pcDNA3 AR:** Es un plásmido de expresión pcDNA3 que contiene clonado el ADNc de AR (receptor de andrógenos) de tipo salvaje. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Guido Jenster (Department of Urology, Josephine Nefkens Institute, Erasmus, The Netherlands).

- **pcDNA3 AR5:** Es un plásmido de expresión pcDNA3 que contiene clonado el ADNc de AR que presenta una delección del dominio de unión al ligando que lo convierte en una proteína constitutivamente activa. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Guido Jenster (Department of Urology, Josephine Nefkens Institute, Erasmus, The Netherlands).
- **pcDNA3 Rb:** Es un plásmido de expresión para ADNc de Rb de tipo salvaje en base a pcDNA3. El mismo fue gentilmente cedido por el Dr. Martin Monte (IQUIBICEN - CONICET).
- **pcDNA3 β-Gal:** Es un plásmido de expresión en base a pcDNA3 para el ADNc de β-galactosidasa, utilizado como reportero o control de transfección.
- **pCI:** plásmido de expresión que contiene un promotor fuerte (pCMV) y un sitio de clonado con varios sitios de corte para enzimas de restricción como se indica en la Figura 16. Además presenta el gen de expresión para neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia frente al antibiótico G-418.
- **pCI p300:** Es un plásmido de expresión para la acetil-transferasa p300 en base a pCI (Smith et al, 2004).

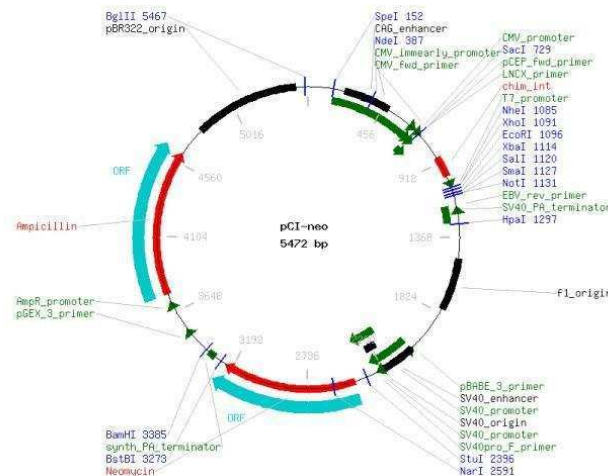


Figura 16. Mapa del plásmido de expresión pCI indicando el sitio de múltiple clonado; la resistencia para ampicilina (Ampicilin); el origen de replicación para *E. coli* (pUC ori) y el origen de replicación para bacteriófagos (f1 ori); el promotor pCMV; y el cassette de resistencia a G-418.

- **shRNA scramble = pKD (Upstate):** plásmido de expresión de siRNA en mamíferos. Este plásmido contiene en el sitio de clonado la secuencia “scramble” (mezclada) o la secuencia de un gen cuya expresión se quiere silenciar. Se lo utiliza como control negativo de silenciamiento de genes (Figura 17).
- **shRNA BRCA1 = pKD shBRCA1 (Upstate):** Este plásmido contiene una secuencia en el sitio de clonado del gen BRCA1 que silencia la expresión del mismo.

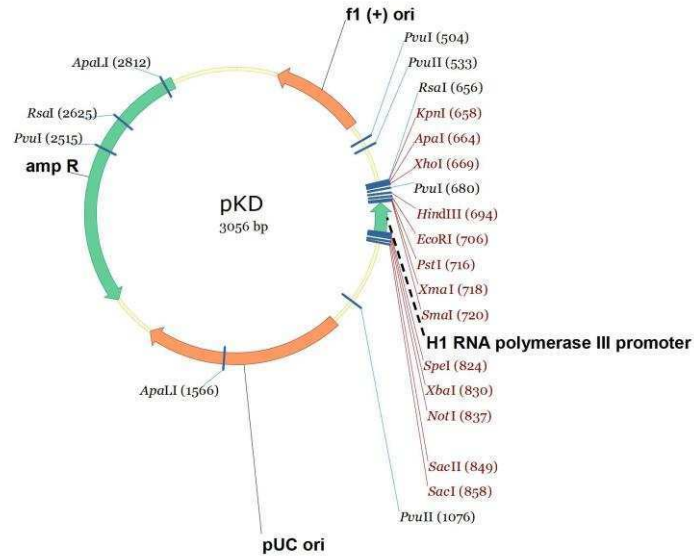


Figura 17. Mapa del plásmido pKD indicando el sitio de múltiple clonado; el promotor (H1 RNA polymerase III); la resistencia para ampicilina (Ampicilin); el origen de replicación para *E. coli* (pUC ori) y el origen de replicación para bacteriófagos (f1 ori).

- **pGIPZ shRNA Scramble (Open Biosystems):** Este plásmido contiene la secuencia para un shRNA Scramble clonado río abajo del promotor CMV entre dos sitios LTVs, por lo que puede ser empaquetado en un vector lentiviral (Figura 18).

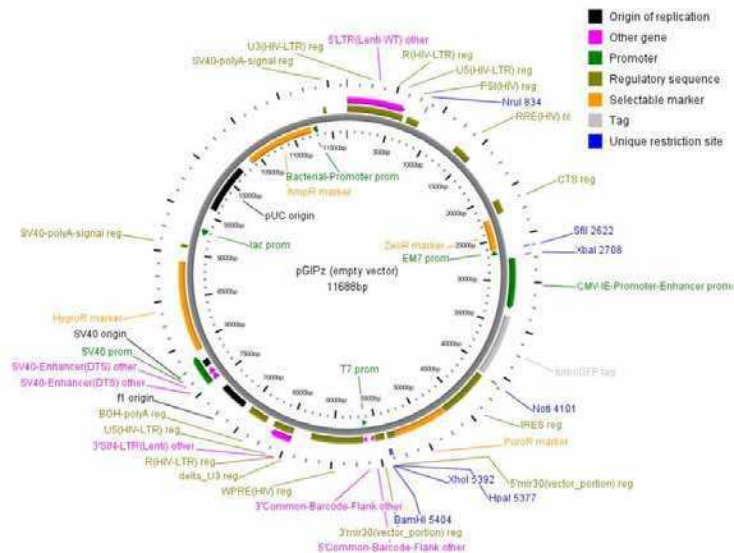


Figura 18. Mapa del plásmido pGIPZ el promotor de citomegalovirus (CMV); la resistencia para ampicilina (Ampr); el origen de replicación para *E. coli* (pUC Ori) y la resistencia a puromicina (PuroR), flanqueados por LTR.

- **pGIPZ shRNA E2F1 A (Open Biosystems):** Este plásmido codifica para un shRNA contra E2F1 (shRNA E2F1 A).

- **pGIPZ shRNA E2F1 B (Open Biosystems):** Este plásmido codifica para un shRNA contra E2F1 (shRNA E2F1 B) distinto del A.

- **pSPAX2 y pMD2G (Addgene):** Son plásmidos de segunda generación para la construcción de partículas lentivirales. El plásmido pSPAX2 (Figura 19A) codifica para la maquinaria de empaquetamiento viral y el plásmido pMD2G (Figura 19B) codifica para las proteínas de la envoltura viral.

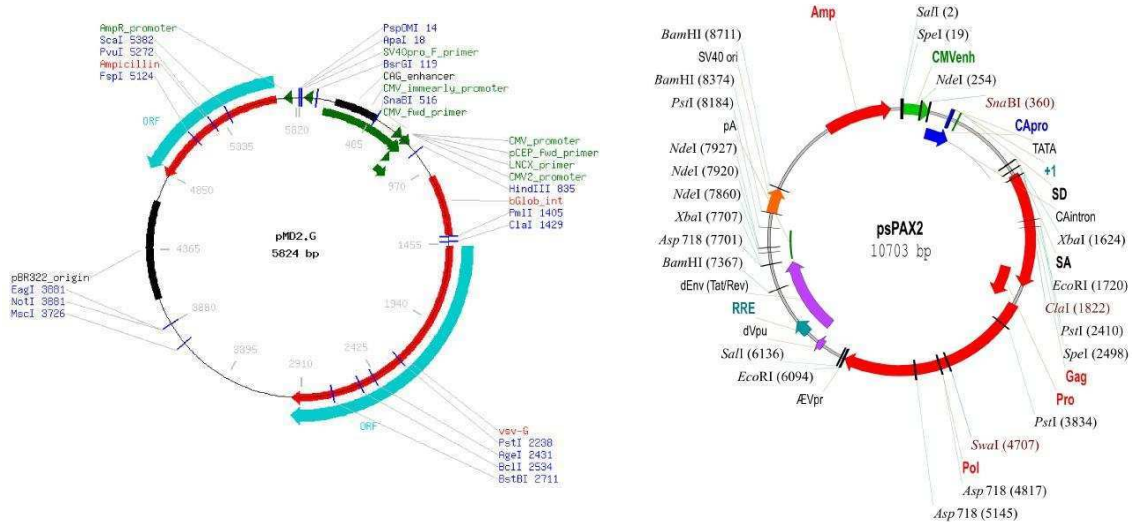


Figura 19. Mapa de los plásmidos pMD2.G y psPAX2. **A)** psPAX2, codifica para la maquinaria de empaquetamiento viral (Gag_HIV). **B)** pMD2.G codifica para las proteínas de la envoltura viral (bGlob_int y VSV-G).

1.7. Transformación de plásmidos en bacterias.

Para la transformación de bacterias con plásmidos, en primer lugar se prepararon bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α competentes. Para ello se inocularon 10 ml de medio de cultivo LB sin ampicilina (peptona 1% m/V; extracto de levadura 0,5 % m/V y NaCl 1% m/V pH = 7,5) con dicha cepa de bacterias y se las incubó a 37°C, 16 h con agitación constante. Luego se inoculó 40 ml de medio LB con 2 ml del cultivo, y se dejó con agitación a 37°C durante 2 h (hasta densidad óptica de 0,4-0,5 a 600 nm). El cultivo se centrifugó a 3.000 rpm, a 4°C durante 5 min. El pellet se resuspendió en 16 ml de CaCl₂ 50 mM frío, se incubó 15 min en hielo y se centrifugó 2 min a 3.000 rpm a 4°C. Nuevamente, se resuspendió el pellet en 2 ml de CaCl₂ 50 mM con glicerol 15 %.

Las células competentes obtenidas se alicuotaron y se guardaron a -70°C. La amplificación de los plásmidos se realizó transformando bacterias competentes. Para ello, se incubó ~1 μ g de plásmido en 100 μ l de bacterias competentes en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó un shock térmico incubando 2 min a 42°C e inmediatamente después se incubó 5 min en hielo. Luego se agregó 450 μ l de LB sin ampicilina y se incubó 1 h a 37°C. Para seleccionar las bacterias transformadas se rastrillaron 100 μ l de cultivo en una placa de LB agar con 50 μ g/ml de ampicilina y se incubaron durante 16 h a 37°C. Se tomó una colonia con un tip y se creció en 2 ml de

medio LB líquido con ampicilina durante 4-6 h. Luego, se inoculó en 100 ml de LB con ampicilina y se crecieron durante 16 h a 37°C con agitación. Se preparó un stock con 15 % de glicerol (400 µl de cultivo con bacterias y 100 µl de glicerol 75%) y se guardó a -70°C. El resto del cultivo se utilizó para hacer la extracción de ADN plasmídico.

1.8. Obtención y purificación del ADN plasmídico.

La extracción se llevó a cabo por el método de lisis alcalina. Para ello el medio de cultivo que contenía las bacterias se centrifugó a 6.000 g 15 min a 4°C (Sorvall SS-34) y el pellet se resuspendió en 10 ml de buffer de lisis P1 (Tris base 0,606 % m/V; Na₂-EDTA-2H₂O 0,372 % m/V pH = 8; 50 µg/ml de RNasa A). Luego se agregó 10 ml de buffer de desnaturalización de ADN P2 (NaOH 0,8 % m/V; SDS 20%), se mezcló por inversión, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, y luego se agregó 10 ml de buffer de re-naturalización P3 (acetato de potasio 29,45 % m/V pH = 5,5). Como existe una gran diferencia de tamaño entre el ADN cromosómico y el plasmídico, éste último de menor tamaño, será el único capaz de re-naturalizar. Por lo tanto se mezcló la solución por inversión y se incubó en hielo durante 20 min para favorecer la re-naturalización. Se centrifugó a 20.000 g durante 30 min a 4°C conservando el sobrenadante y se centrifugó nuevamente (20.000 g, 15 min). El ADN se precipitó del sobrenadante obtenido con 0,7 volúmenes de isopropanol y centrifugación durante 30 min (15.000 g, 4°C). El pellet de ADN plasmídico se lavó con 5 ml de etanol 70 %, se centrifugó (10 min, 15.000 g), se secó y se resuspendió en 300-500 µl de buffer TE pH=8. El plásmido aislado se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant Pro).

CAPITULO II

***Métodos para el análisis de la
expresión de genes, proteínas y
ensayos celulares***

2.1. Western blot

2.1.1. Aislamiento de proteínas totales para Western blot

Las células se crecieron en placas (100 mm) y se expusieron a los tratamientos indicados. Se descartó el medio de cultivo y se lavaron dos veces con 3 ml de PBS frío con inhibidores de proteasas y fosfatasa (NaF 0,375 mM + PMSF 0,5 mM). Las células se cosecharon con 500 μ l de PBS con inhibidores en hielo utilizando una espátula y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Al pellet de células se le adicionó 200 μ l de buffer de lisis RIPA [Tris-HCl 50 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 20 mM pH = 8; Deoxicolato de Sodio 1%; SDS 0,1%; Triton X-100 0,1%; NaF 0,5 mM; NaVO₄ 0,8 mM; PMSF 0,5 mM y Mammalian Protease Inhibitors (Sigma-Aldrich)]. El lisado se recolectó en tubos de 1,5 ml, se incubó 10 a 20 min en hielo y se sonicó dos veces durante 10 segundos a 10 % de potencia, a 4°C en un sonicador Branson Sonifier Cell Disruptor. Luego se centrifugó 20 min a 12000 rpm a 4°C en una centrífuga Sanyo (HAWK 15/05), se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C. Se cuantificaron los niveles de proteína totales utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Luego, las proteínas totales se diluyeron con buffer de lisis RIPA y buffer de siembra (Tris-HCl 10 mM; pH = 8; SDS 1%; Glicerol 4%; Sacarosa 0,146 M y azul de bromofenol; DTT 10 mM ó β -mercapto etanol 1%) en una concentración de 2 μ g de proteína/ μ l y se incubó durante 5-10 min a 90°C, con el objeto de desnaturalizar a las proteínas y romper los puentes di-sulfuro intercatenarios. Las proteínas obtenidas de esta manera se utilizaron para el análisis por la técnica de Western blot.

2.1.2. Cuantificación de proteínas totales: Método de Bradford

El método de Bradford se realizó en una placa de 96 pocillos, en la misma se diagramó una curva de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA): 2 mg/ml; 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,0625 mg/ml y 0,03125 mg/ml. Se sembraron 10 μ l de cada dilución por duplicado en una placa de 96 pocillos. Las muestras se diluyeron 1:10 con buffer RIPA y se sembraron 10 μ l por pocillo por triplicado. Posteriormente, se agregaron 200 μ l del colorante Bradford y se leyó a 595 nm de absorbancia en un lector de ELISA (Microplate Absorbance Reader, BIORAD) o a 600 nm en el lector de ELISA Glomax Multidetecion System (Promega). Se realizó la curva de absorbancia vs concentración, utilizando las lecturas de los estándares, y por regresión lineal se obtuvo la ecuación que relaciona masa de proteína con absorbancia.

Este método se utilizó para lisados de proteína realizados con buffer de lisis con menos de 0.2% de SDS o concentraciones elevadas de DTT.

2.1.3. Método del ácido bicinconínico (BCA)

El método del ácido bicinconínico (BCA) para la cuantificación de proteínas se utilizó en lugar del método de Bradford, para buffers que contengan más de 0,2 % de SDS. La curva patrón de BSA y la dilución de las muestras se realizaron del mismo modo que para la cuantificación por Bradford y se sembraron 10 µl por pocillo por duplicado. Posteriormente, se agregaron 200 µl del colorante BCA (BCA 98% y CuSO₄ 2%; Sigma), se incubó 30 min a 37 °C y se leyó a 570 nm en un lector de ELISA (Microplate Absorbance Reader, BIORAD) o a 560 nm en el lector de ELISA Glomax Multidetecion System (Promega). Se realizó la curva de absorbancia vs concentración, utilizando las lecturas de los estándares, y con la pendiente de la curva se calculó la concentración de proteínas de las muestras.

2.1.4. SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Los lisados proteicos (60 µg) se resolvieron por SDS-PAGE conteniendo 6 % de poliacrilamida (para resolver proteínas con un peso molecular superior a 150 kDa), 10-12% (para resolver proteínas menores a 150 kDa) y 15-18% (para resolver proteínas menores a los 20 kDa). Para ello, los geles se armaron con Buffer (Tris 0,40M pH = 8,8); mezcla de Acrilamida/Bisacrilamida (6, 12 o 18 %); SDS 0,1%; APS 0,1%; TEMED 0,24%V/V. Las muestras de proteínas se resolvieron corriendo en paralelo un marcador de peso molecular (2 µl de PageRuler Plus Prestained Protein Ladder - Fermentas) en una cuba de electroforesis (BIORAD POWERPAC Basic) durante 1 h a 80 V hasta que las muestras pasen el gel concentrador (Tris 0,128 M; SDS 0,1%; Acrilamida/Bisacrilamida 3,85%; APS 0,1%; TEMED 0,2 % V/V; pH = 6,8) y luego a 120 V en Buffer de Electroforesis (25 mM Tris; 192 mM Glicina; SDS 0,1%). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BIORAD POWERPAC Basic) durante 2:30h a 65 V (aproximadamente 300 mA), cuando se corrieron geles 6% y durante 1:30 h a 250 mA (aproximadamente 45 V) en el caso de los genes 10-12 o 18%. En ambos casos la solución de transferencia utilizada fue Towbin (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1% pH= 8,3) suplementado con 20 % de metanol.

2.1.5. Western blot

Para determinar la eficiencia de la transferencia, la membrana se lavó con 5 ml de H₂O durante 5 min y se incubó con una solución de Rojo Ponceau S 0,1% en ácido acético glacial 5 % por 5 min. El colorante de la membrana se lavó con 5 ml de H₂O 5 min y luego tres veces con TBS-T (NaCl 150 mM; KCl 2,68 mM; Tris base 24,8 mM; Tween-20 0,05 %V/V, pH = 7,4) durante 5 min.

Se procedió a bloquear las proteínas inespecíficas durante 40 min con 10 ml de solución de bloqueo (leche descremada en polvo 4% en TBS-T o BSA 4% en TBS-T, en el caso de proteínas que se fosforilan) con agitación. Una vez finalizado el bloqueo, la membrana se lavó con TBS-T y se incubó con agitación continua durante 16 h a 4°C con el anticuerpos primarios específicos: Laminina A/C (636, dilución 1/500) y β -actina (I19, dilución 1/1000), ATM (5C2, dilución 1/500) de Santa Cruz Biotechnology, CtBP1 (BD Biosciences, dilución 1/2000) y γ H2AX (Millipore, dilución 1/600). Todas las diluciones se llevaron a cabo en TBS-T con BSA 0,4 %. El anticuerpo contra la proteína BRCA1 utilizado es policlonal generado en conejo en el laboratorio del Dr. Kevin Gardner (NCI, NIH, Bethesda, EE.UU.) (De Siervi et al, 2010).

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con TBS-T durante 5 min con agitación. Luego, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1-2 h a temperatura ambiente con agitación continua. Todos los anticuerpos secundarios fueron diluïdos en BSA 0,4 % en TBS-T: anti-conejo HRP (dilución 1:4000), anti-cabra HRP (dilución 1:3000) o anti-ratón HRP (dilución 1/5000) de Santa Cruz Biotechnology. Finalmente, se realizaron tres lavados con TBS-T durante 10 min con agitación.

Las proteínas se detectaron con el reactivo de ECL (Amersham Pharmacia) de acuerdo a las indicaciones del proveedor y revelando en el Phosphorimager (Fuji Photo Film Co. Ltd., Cypress, CA). Alternativamente la detección se realizó ECL no comercial mezclando 1,5 ml de Reactivo 1 (luminol 29,7 mM; Tris 68,4 mM pH = 8), 1 ml de Reactivo 2 (4- iodofenol 18,2 mM; Tris 10,4 mM pH = 8), 100 μ l de Tris 1M pH = 6,8 en un volumen final de 20 ml y agregando en el momento de usar 5 μ l de H₂O₂ de 30 volúmenes.

La densidad de la banda se cuantificó con el programa Image J y los valores correspondientes a cada una de las bandas de expresión de proteínas se normalizaron con los valores de β -actina o Laminina A/C y con el tratamiento control. Cada experimento se repitió al menos tres veces.

2.2. Análisis de expresión génica a nivel de ARN mensajero

2.2.1. Aislamiento de ARN

Para el aislamiento del ARN total de líneas celulares en cultivo se utilizó el reactivo Tri-Reagent (Genbiotech) como lo detalla el fabricante con algunas modificaciones. Las células se crecieron en placas de Petri de 100 mm o 60 mm y se realizaron los tratamientos correspondientes de acuerdo a cada experimento. Al momento de cosechar las células se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 4 ml de PBS. Luego, se colectaron las células utilizando una espátula con 500 µl de Tri-Reagent y la suspensión celular se homogeneizó completamente por pipeteo con tip de p1000 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se añadieron 100 µl de cloroformo, se mezcló enérgicamente con vortex durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Para acelerar la separación de fases se centrifugó a 12.000 rpm 4°C durante 15 min conservando la fase acuosa que contiene el ARN. El ARN se precipitó con 250 µl de isopropanol por cada 500 µl de Tri-Reagent incubando a -20°C durante 30-40 min. Se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75 %. Se centrifugó a 7.500 rpm a 4°C durante 5 min y se removió el sobrenadante. Para eliminar las trazas remanentes de etanol, el pellet se secó a 50°C durante 3 min, se resuspendió en 30 µl de H₂O libre de RNAsas y se rehidrató incubando 10 min a 55-60°C. El ARN extraído se conservó a -70°C, o bien, se utilizó en reacciones de transcripción reversa.

La concentración y la pureza del ARN se midió en espectrofotómetro (Gene Quant Pro, Amersham Biosciences) midiendo la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) y a 280 nm (A₂₈₀). La concentración de ARN se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Concentración de ARN} = 40 \times A_{260} \times \text{factor de dilución} \times \mu\text{g/ml} \quad (1)$$

Donde 40 es la constante de Lambert-Beer para una cuba de cuarzo de 1 cm de camino óptico. La pureza se calculó realizando el cociente entre A₂₆₀ y A₂₈₀, siendo 2 el cociente que corresponde a una muestra de ácido nucleico que no contiene impurezas proteicas. Para realizar la transcripción reversa se utilizaron siempre concentraciones del ARN mayor a 1 µg/µl con una pureza mayor a 1,7 lo cual asegura la buena calidad del ADNc.

2.2.2. Obtención del ADNc: Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)

El ADNc se sintetizó a partir del ARN total mediante transcripción reversa o retrotranscripción (RT) utilizando el kit RevertAid RT (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, se preparó una mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla (Tabla 3):

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

Tabla 4. Transcripción reversa.

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

2.2.3. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

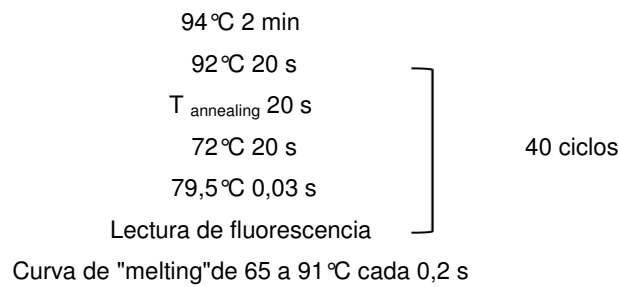
El ADNc se amplificó por qPCR utilizando el kit de *Taq* DNA Polimerasa (Fermentas). Dos microlitros (2 µl) de una dilución 1:10 del ADNc obtenidos en la RT, se amplificaron en una mezcla de reacción con buffer de reacción (1X); MgCl₂ (2 mM); oligos específicos (0,4 µM); dNTPs (0,2 mM); 0,025 µl de SYBRgreen y 0,03 U/µl de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Fermentas) en un volumen final de 25 µl.

Los *primers* utilizados se diseñaron con el programa Beacon Designer 5 y se testearon con el UCSC Genome Browser Home URL. Las secuencias de los *primers* específicos para cada uno de los genes analizados se muestran a continuación:

Nombre	Secuencia (5' - 3')		Temp Annealing
	Primer forward	Primer reverse	
Actina	CTCCGACCAGTGTTCCT	ATGGTGAGCTGCGAGAATAGC	60° C
ATM	CCGCGGTTGATACTACTTTGACC	GCAGCAGGGTGACAATAACAAGTAA	60° C
DDB2	TCACTTCCAGCACCTCACAC	ACGTCGATCGTCCTCAATTC	58° C
MAD2L1	AATACGGACTCACCTTGCTTGTAACTAC	TGCCATCTTTCCAGGACCTCACCC	58° C
H2AX	TTGGCTTCACGGCTGGCTATG	TTGTGCTGGTATCTAGGTGCTTGG	60° C
CtBP1	TACAGCGAGCAGGCATCC	TGGTCCTTGTGACACAGTTC	60° C
BRCA1	TGAAATCAGTTTGGATTCTGC	CATGCAAGTTTGAAACAGAAC	57° C
BRCA1 inm	CAGGGAGAAGCCAGAATTGA	AAACTCTTCCAGAATGTTGTTAAGTC	58° C

Tabla 5. Secuencia de primers para amplificar ADNc por qPCR

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



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

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

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

$$\Delta C_T = C_T (\text{NRT}) - C_T (\text{muestra}) \quad (3)$$

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

$$V_{Ia} = 2^{\Delta C_T} \quad (4)$$

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

$$V_{Ib} = \frac{V_{Ia}(\text{muestra})}{V_{Ia}(\text{actina } \beta)} \quad (5)$$

Donde V_{Ib} representa las veces de inducción normalizada a β -actina. Finalmente, los datos se normalizaron respecto al control (V_{In}).

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

$$Vl_b = \frac{\sum_{x=1}^n (C_{T,x} - C_T)^2}{(n - 1)} \quad (6)$$

Donde n es el tamaño de la muestra.

Luego, el error se calculó como la raíz cuadrada de la suma de los errores de los CT de las muestras, de los CT de los NRT y de los CT de β -actina como se describe en (Smith et al., 2004), aplicando la siguiente fórmula:

$$E = [(ds/C_T)_{NRT}^2 - (ds/C_T)_{muestra}^2 - (ds/C_T)_{actina}^2]^{1/2} \quad (7)$$

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

2.3. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

2.3.1. Crosslink

Las células se crecieron en placas de Petri de 100 mm a una confluencia del 80 % y se trataron de la forma descrita previamente en esta sección. Luego del tratamiento se realizó un *crosslink* de las proteínas y el ADN con 1% de formaldehído con agitación durante 10 min en hielo, partiendo de 6-8 placas de 100 mm por cada tratamiento en un volumen de 5 ml de medio de cultivo. Las células se incubaron con glicina 125 mM para detener el *crosslink* durante 15 min con agitación en hielo. El medio se descartó y se lavó con 3 ml de PBS frío con inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 0,375 μ M y PMSF 0,5 mM). Luego, se removieron las células de la placa con 600 μ l del mismo PBS utilizando una espátula y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml para ser centrifugadas a 3000 rpm 5 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS y se conto el número de células. Posteriormente se dividieron en tubos conteniendo $7,5 \times 10^6$ células en un volumen final de 500 μ l resuspendidas en buffer de lisis [125ul de Tris pH = 7,4, 250ul de SDS 10%, 12.5ul IP, para 2.5 ml]. El ADN se fragmentó utilizando el sonicador de baño Bioruptor™ UCD-200. El sonicado se realizó en tubos de 15 ml conteniendo 500 μ l de cada lisado ($7,5 \times 10^6$ células) a potencia H (high) durante 10 min con intervalos de 30 s (30s prendido - 30s apagado), a los efectos de lograr un enriquecimiento del ADN en fragmentos de 300 pb (con fragmentos entre 500 pb y 200 pb).

El tamaño del los fragmentos de ADN se chequeó por electroforesis en geles de agarosa 1% como se indica más adelante. Finalmente se centrifugó a 12.500 rpm,

durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se lo utilizó para realizar la inmunoprecipitación de cromatina.

2.3.2. Electroforesis en gel de agarosa

Previamente a la inmunoprecipitación, en primer lugar se chequeó la fragmentación del ADN a partir de 30 µl de los lisados que fueron sometidos al *crosslink*. La extracción de ADN se realizó por el método de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1), como se detalla más adelante.

En una cuba de electroforesis horizontal (Wide Mini-Sub GT, BioRad) se armó un gel de agarosa 1 % con bromuro de etidio (0,01 µg/ml) en buffer de electroforesis TAE (Tris- Acetato 40 mM pH = 8; EDTA 1 mM). Se sembraron 12 µl de muestra conteniendo 2 µl de buffer de siembra (glicerol 50%; EDTA 50 mM pH = 8; SDS 10 %; orange G 0.2 % m/V) y 2 µl de un marcador de peso molecular de 100 pb (Productos Bio-Lógicos) y 2 ml de un marcador de 1 kb (Productos Bio-Lógicos). La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min, utilizando una fuente de poder PowerPac Basic (BioRad). La corrida se visualizó y fotografió en un transiluminador de luz UV (G:Box, Syngene).

2.3.3. Inmunoprecipitación

Para realizar el ChIP se mezclaron 200 µl (2×10^6 células) de los lisados que se habían sometido al *crosslink* y 20 µg del anticuerpo específico contra BRCA1, o bien 5 µg de anticuerpo específico contra E2F1, CtIP y CtBP1 (Santa Cruz Biotechnology). Como control de especificidad se armaron tubos con un anticuerpo no específico IgG (10 µg) o GAL4 (0,5 µg) para cada muestra. Todos los tubos se suplementaron con inhibidores de proteasas MPI (Sigma). Los tubos se incubaron 16 h con agitación rotatoria a 4°C.

Simultáneamente, se bloquearon las *beads* o esferas de agarosa (Proteína G-Sepharose, Invitrogen). Para ello, previamente se lavaron 500 µl de *beads* tres veces con 1 ml de buffer IP [Tris 50 mM pH = 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM pH = 8; NP40 0,5 %; Triton X-100 1% e inhibidores de proteasas MPI (Sigma)] y se centrifugaron 3 min a 2.000 rpm. Luego, se resuspendieron en un volumen final de 500 µl de buffer IP con inhibidores de proteasas, BSA (2 mg/ml), ADN de esperma de salmón (1 mg/ml) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron cinco veces las *beads* con 1 ml de buffer IP y centrifugando 3 min a 2.000 rpm. Finalmente el pellet se resuspendió con 500 µl de buffer IP con inhibidores de proteasas.

A continuación, se agregaron 50 µl de *beads* bloqueadas a cada inmunoprecipitación y se incubó 16 h a 4°C con rotación. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 1 ml de *buffer IP* conteniendo NaCl (500 mM), se mezcló diez veces por inversión y se

centrifugó a 2.000 rpm durante 3 min a 4°C. Luego se realizaron tres lavados con 1 ml de *buffer IP* y posteriormente, se realizó un lavado con 1 ml de *buffer TE* (pH = 8). Las *beads* se resuspendieron en 300 µl de *buffer TE* y el *crosslink* se revirtió incubándolas durante 16 h con 0,5% de SDS y 0,2 mg/ml de proteinasa K (Invitrogen) a 65°C. De la misma manera se revirtió el *crosslink* de 20 µl de muestra sin inmunoprecipitar para utilizarlo como input.

La extracción del ADN del ChIP se realizó por el método de Fenol: Cloroformo: Isoamílico. En primer lugar se precipitaron las *beads* dos veces centrifugado a 2.000 rpm, durante 3 min conservando el sobrenadante que contiene el ADN del ChIP. Para aislar el ADN se realizaron dos extracciones con 1 volumen de Fenol: Cloroformo: Isoamílico (25:24:1) mezclando con vortex durante 30 s y centrifugando a 12.500 rpm 10 min a 4°C. Con la fase acuosa obtenida se realizó una nueva extracción con 1 volumen de cloroformo. Nuevamente se centrifugó a 12.500 rpm a 4°C 10 min y se conservó la fase acuosa. El ADN se precipitó con dos volúmenes y medio de isopropanol y acetato de sodio pH = 5,2 a una concentración final de 150 mM mezclando por inversión 4-6 veces e incubando durante 2 h a -80°C. Luego de centrifugar (12.500 rpm, 15 min), el pellet se lavó con el agregado de 500 µl de Etanol 70 %, centrifugando nuevamente (12.500 rpm, 5 min). El ADN obtenido se secó en bloque térmico a 65°C y se resuspendió en 200 µl de agua libre de nucleasas conservándose a -20°C. Finalmente las muestras de ADN del ChIP y de los input se amplificaron por qPCR como se detalla a continuación.

2.3.4. Amplificación del ADN del ChIP

La amplificación se llevó a cabo por qPCR. Se amplificaron 12 µl del ADN del ChIP en una mezcla con *buffer* de reacción (1X); MgCl₂ (2 mM); *primers* específicos (0,4 µM); dNTPs (0,2 mM); 0,025 µl de SYBRgreen y 0,03 U/l de Taq DNA polimerasa recombinante (Fermentas) en un volumen final de 25 µl. La reacción de qPCR se llevó a cabo en un aparato DNA Engine Opticon (MJ Research) utilizando el programa de amplificación que se detalla en la sección anterior. Los *primers* utilizados para amplificar cada uno de los genes de interés se indican a continuación (Tabla 6).

Para cada experimento se realizaron al menos dos réplicas biológicas y cada muestra se amplificó por duplicado. Se utilizaron dos métodos de normalización; la normalización de los valores con el control "input" y el control inespecífico (IgG no específico o anti-GAL4), o bien, el enriquecimiento fue expresado como porcentaje de ADN inmunoprecipitado con respecto al ADN total (input). Ambas metodologías se basan en el método del $\Delta\Delta CT$ modificado (Devore, 2007; Livak & Schmittgen, 2001; Weisstein, 2007).

Secuencia (5' - 3')

Nombre	Primer forward	Primer reverse	Temp Annealing
ATM -0,5 Kb	CGCCGCATCTCCTGGTTC	AAGTGACGACAGTTCCGAAGG	58°C
ATM -3,5 kb	CCTTCTGTCGCTCTCTACTG	AATATGGCTGCTTCTCCTG	58°C
ATM -1 kb	TGACCCACAAACAATCCCTCCTC	TTCTCCATCCTCCACGCAATACG	58°C
ATM -1,5 kb	AAGCAGGAAGTCAGCAGAGTAG	AGAAAGCCCTAAGAAAGCAGTATC	58°C
ATM +1 kb	GTGGATGATAATGTATGTGGTGATAGG	CCAAGGTAACACTGCGAGGTC	58°C
BRCA1 -0,4Kb	TTCCCTCCACCCCCCAACAATC	CCCAATCCCCCACTCTTTCCGCC	59°C
BRCA1 0Kb	CGACTGCTTTGGACAATAGGTAGCG	AGTCTGCCCCCGGATGACGTAA	58°C
BRCA1 +31 Kb	CCTGTGTGAGAGAAAAGAATGGAATAAGC	TGAATGCTGCTATTTAGTGTTATCCAAGG	58°C
BRCA1 -55 Kb	AAAGAGATGGGACTGTAAGTGAAGGACC	TGTTTATAGGGAGACTGATGAATGGGC	58°C
BRCA1 +62 Kb	GCGGGAGGAAAATGGGTAGTTAGC	CCATTTCCAGCATCACCAGC	58°C

Tabla 6. Secuencia de *primers* para amplificar ADN de ChIP por qPCR.

Para cada experimento se realizaron al menos dos réplicas biológicas y cada muestra se amplificó por duplicado. Se utilizaron dos métodos de normalización; la normalización de los valores con el control “input” y el control inespecífico (IgG no específico o anti-GAL4), o bien, el enriquecimiento fue expresado como porcentaje de ADN inmunoprecipitado con respecto al ADN total (input). Ambas metodologías se basan en el método del $\Delta\Delta CT$ modificado (Devore, 2007; Livak & Schmittgen, 2001; Weisstein, 2007).

En el primer caso (normalización con input y control inespecífico), se calculó el promedio de los valores de CT como se describió anteriormente en la fórmula (2). Cada experimento y muestra de IgG se normalizó a la señal obtenida de un input de la muestra control; esta representa el valor de ΔCT indicado en la siguiente fórmula:

$$\Delta C_{T \text{ no esp}} = \bar{C}_{T \text{ input}} - \bar{C}_{T \text{ no esp}} \quad (8)$$

$$\Delta C_{T \text{ esp}} = \bar{C}_{T \text{ input}} - \bar{C}_{T \text{ esp}}$$

Donde “no esp.” es el ChIP realizado con el anticuerpo no específico (anti-IgG o anti-GAL4) y “esp.” es el ChIP realizado con el anticuerpo específico.

Luego, se calculó el $\Delta\Delta CT$ que representa la relación entre la cantidad de ADN inmunoprecipitado con anticuerpo específico y la cantidad de ADN inmunoprecipitada con anticuerpo no específico:

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

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

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

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

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

Por último, para calcular el porcentaje de ADN inmunoprecipitado con respecto a la cantidad de ADN total (input) se dividió las veces de inducción por el factor $F = 10$, teniendo en cuenta que para extraer los input se utilizaron diez veces menos de volumen de lisado que para la inmunoprecipitación. Por último este valor se multiplicó por 100 para expresar el enriquecimiento en porcentaje, de acuerdo a la fórmula:

$$VE (\% \text{ Input}) = VE \times 100 / 10 \quad (12)$$

2.4. Ensayo de genes reporteros

2.4.1. Transfección transiente por el método de lipofectamina 2000

Para realizar la transfección por el método de lipofectamina, las células PC3 o LNCaP se crecieron en placas de 12 pocillos hasta una confluencia del 90 %. Luego, se diluyeron 1,5 μl de lipofectamina 2000 en un volumen de 50 μl de medio RPMI sin antibióticos ni SFB. En paralelo, se diluyeron 1 μg de plásmido reportero y, en los casos que fueron necesarios, 1 μg de plásmido de expresión o silenciamiento, en 50 μl de medio RPMI sin antibióticos ni SFB. Ambas mezclas se incubaron 5 min a temperatura ambiente, luego se mezclaron y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS y luego se les agregó 300 μl de medio RPMI (sin antibióticos ni SFB) por pocillo. Finalizada la incubación se agregaron 100 μl de la mezcla lipofectamina 2000/plásmidos gota a gota a cada pocillo y se incubó durante 5 h en estufa a 37°C con atmósfera de CO_2 5 %. Transcurrido ese período, se reemplazó la solución con medio fresco como se describió previamente.

Se realizaron los tratamientos anteriormente descritos de acuerdo a lo indicado para cada experimento en la sección *Resultados* y se determinó la actividad de luciferasa 48 h post-transfección en el caso de las co-transfecciones con plásmidos de expresión, y 72 h post-transfección cuando se trabajó con plásmidos de silenciamiento.

2.4.2 *Medición de actividad de luciferasa*

Se midió la actividad de luciferasa utilizando el reactivo *Steady Glo Luciferase System* (Promega), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS, se lisaron por incubación durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad con 40 μ l de RPMI sin rojo fenol y 40 μ l de reactivo de luciferasa (Promega).

La actividad de luciferasa se determinó en 20 μ l de cada lisado en el luminómetro *Glomax Multidetector System* (Promega). Los datos se normalizaron con la concentración de proteínas totales realizada por el método colorimétrico de Bradford.

Para la normalización de los resultados no se utilizaron métodos que consideren controles internos de transfección, como Renilla o actividad de β -galactosidasa, ya que cuando se usan otros reporteros como control interno estos pueden competir cuando se realiza un tratamiento con agentes genotóxicos u hormonas (Mulholland et al, 2004; Sims et al, 2003).

2.5. Ensayo de transformación celular y formación de focos.

Las células NIH 3T3 fueron plaqueadas y transfectadas en un 70-80 % de confluencia, por medio de la técnica de fosfato de calcio, con los plásmidos de expresión de CtBP1 a diferentes concentraciones. Las células se mantuvieron en las condiciones de cultivo anteriormente descritas, con cambio de medio de cultivo cada 2 días y observando el crecimiento celular y la formación de focos al microscopio por al menos 2-3 semanas. Al cabo de este tiempo, las células se fijaron con Metanol por 30 min y luego se lavaron y secaron por 24 h. Al día siguiente, se tiñeron con una solución de cristal violeta (0,1 % m/v en ácido fósfórico 200 mM pH = 6) por 5-10 min y luego se lavaron con H₂O destilada. Una vez secas las placas fueron fotografiadas utilizando el equipo *Phosphorimager* (Fuji Photo Film Co. Ltd., Cypress, CA) y se cuantificaron el número de focos para los distintos tratamientos.

2.6. Ensayo clonogénico por formación de focos.

Para el caso de la formación de focos en células PC3, se utilizaron las células de expresión estable, PC3.pcDNA3 CtBP1 y PC3.shRNA CtBP1. Se plaquearon 1000 o 5000 células en placas de 10 cm y se mantuvieron en condiciones de cultivo por 2 semanas. Transcurrido ese tiempo, se fijaron y tiñeron con una solución de cristal violeta, tal como fue descrito anteriormente. Las placas se fotografiaron y

posteriormente el número de focos se cuantificó utilizando el software GelPro Analyzer v4.0.

2.7. Ensayo de viabilidad celular (MTS).

Para los ensayos de viabilidad celular, se sembraron 1.800 células PC3 y sus derivadas estables (PC3.shCtBP1 y PC3.CtBP1) por pocillo en una placa de 96 pocillos y se crecieron en 200 μ l de medio de cultivo RPMI suplementado con antibióticos y concentraciones variables de SFB (según se indique en la sección de resultados) o suero extraído de ratones de la cepa nude o C57BLJ6 que fueron alimentados con dietas modificadas; y fueron mantenidas en condiciones de cultivo (37°C y CO₂ 5 %) durante 72 h. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

La viabilidad celular se determinó utilizando el reactivo comercial Cell Titer 96 wells Aqueous non Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La solución comercial de MTS (2 ml) se mezcló con la solución comercial PMS (100 μ l) y se conservó en alícuotas a - 20°C protegido de la luz. Al momento de cosechar las células se reemplazó el medio de cultivo de las placas de 96 pocillos con 100 μ l de medio de cultivo fresco y se agregaron 20 μ l de MTS/PMS por pocillo. Como blanco de reacción se utilizaron 3 pocillos sin células con 100 μ l de medio de cultivo. Las placas se incubaron de 1-4 h en estufa a 37°C con CO₂ 5 %, en oscuridad y se midió la absorbancia a 490 nm en lector de ELISA (Microplate Absorbance Reader, BIORAD).

La viabilidad celular para cada tratamiento se calculó como el porcentaje de la relación entre el promedio de la absorbancia de los triplicados y el promedio de la absorbancia de los triplicados de las muestras control.

CAPITULO III

Estudios in vivo

3.1. Experimentos con xenotransplantes.

Los ratones xenotransplantados con células shRNA BRCA1 o shRNA scramble control fueron previamente generados (De Luca et al, 2011).

En esta tesis se desarrollaron los ratones xenotransplantados con células PC3 de tipo salvaje y las generadas por modulación de la expresión de CtBP1, PC3.shRNA CtBP1 y pcDNA3 CtBP1. Para ello, los ratones atímicos nude nu/nu se adquirieron del bioterio de la Universidad de La Plata y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos de acuerdo a las normas de cuidado de la Universidad de Buenos Aires.

Se utilizaron ratones de 4 semanas de edad que se alimentaron con una dieta control (n = 30) en base a pellets o una dieta de alto contenido calórico (n = 30) generada por el agregado de grasa de origen animal a los pellet en una proporción 2:1. La dieta de alto contenido calórico presentó un valor energético de 5 Kcal/gr día mientras que la dieta control tan solo de 3 Kcal/gr de comida. Los animales se pesaron tres veces por semana utilizando balanza digital. Al cabo de 11 semanas, fueron inoculados con células PC3, PC3.pcDNA3 CtBP1 o PC3.shRNA CtBP1 en el flanco izquierdo del animal. Se midió el tamaño tumoral de los xenotransplantes tres veces por semana, utilizando un calibre digital y el volumen tumoral se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$0,523 \times \text{ancho}^2 \times \text{largo} \quad (13)$$

donde el ancho representa la dimensión de menor tamaño del tumor. Al cabo de 4-6 semanas post-inoculación los animales se sacrificaron.

Una vez sacrificados, se obtuvo sangre vía intracardiaca, la cual se dejó coagular para separar la fracción plasmática del suero. El suero de estos animales se lo utilizó para la determinación de los niveles de glucemia (Glucostix®, Bayer), de colesterol (Colestat enzimático AA, Wiener Lab), de triglicéridos (TG color GPO-PAP, Wiener Lab) y de estradiol y testosterona (COAT-A-COAT, Siemens). Además, el suero extraído de estos animales fue deplementado por incubación a 56°C, filtrado para su esterilización y utilizado para suplementar el medio de cultivo RPMI (2,5 % (v/v)) e incubar las células tumorales de PCa para diferentes ensayos.

Además, se extirparon los tumores de los ratones y se determinó el volumen y el peso tumoral. Luego los tumores se cortaron en fracciones de entre 2 y 4 mm. Una porción se sumergió en 1 ml de Tri-Reagent (Genbiotech), se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C para extraer el ARN total. Otras fracciones de tejido fueron sumergidas inmediatamente en formalina tamponada para su fijación y

posterior realización de cortes histológicos. Además, una fracción de tumor también fue sumergida en nitrógeno líquido y posteriormente conservada a -80°C .

Para el procesamiento de los tejidos para la obtención tanto de ARN como del extracto proteico, las muestras se disgregaron mecánicamente con un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turrax). La extracción de ARN se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor tal como se explicó previamente. La inclusión de tejido en parafina y la generación de cortes histológicos se detallan en la siguiente sección.

También se tomaron muestras de otros tejidos como hígado y riñón, principalmente para la obtención y generación de cortes histológicos.

3.2. Ratones C57BL6J.

Ratones machos de la cepa C57BL6J de 4 semanas de edad se alimentaron durante 16 semanas con una dieta control o dieta hipercalórica, como fue descrito anteriormente ($n = 8$). Se determinaron los pesos de los animales 3 veces por semana y finalmente se procedió a la recolección de sangre de estos animales. Se separó el plasma del suero y se determinaron diferentes parámetros bioquímicos en estos, como la determinación de niveles de glucemia (Glucostix®, Bayer), colesterol (Colestat enzimático AA, Wiener Lab) y triglicéridos (TG color GPO-PAP, Wiener Lab) y hormonales, estradiol y testosterona (COAT-A-COAT, Siemens). Además el suero fue deplementado por incubación a 56°C y filtrado para su esterilización. Se utilizó el suero proveniente de estos animales alimentados con dieta control o dieta hipercalórica para suplementar medio de cultivo RPMI a una concentración de 2,5 % (v/v) e incubar las células tumorales de PCa.

3.3. Determinaciones bioquímicas.

A partir del suero extraído de los diferentes animales, tanto los nude xenotransplantados como los ratones de la cepa C57BL6J que fueron alimentados con las dietas control o hipercalórica, se procedió a la determinación de diferentes parámetros bioquímicos. Para ello se utilizaron los reactivos gentilmente cedidos por la empresa Wiener Lab y se siguieron las especificaciones del fabricante. Brevemente, tanto para la determinación de colesterol como de triglicéridos, 10 μl de suero o de 10 μl de estándar de concentración fueron incubados con 1 ml de reactivo de trabajo y se incubaron por 5 min a 37°C . Inmediatamente después estos fueron leídos en espectrofotómetro a 505 nm. Para el cálculo de los resultados se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Colesterol o triglicéridos (g/l)} = \text{DO}_{505\text{nm}} \text{ muestra} \times \frac{2,00 \text{ g/l}}{\text{DO}_{505\text{nm}} \text{ estándar}} \quad (14)$$

Para la determinación de la glucemia en sangre de estos animales, 5 a 10 μl de sangre recientemente extraída vía intracardiaca se depositó sobre la fracción reactiva de las tiras Glucostix® (Bayer), por 30 segundos, se secó suavemente la gota con papel absorbente y a los 90 segundos se comparó el color observado sobre la tira con un patrón de colores provisto por el fabricante que representa la concentración de glucosa en mg/dl.

3.4. Radio-inmuno ensayo (RIA) para la determinación de los niveles de testosterona y estradiol séricos e intratumorales.

Se realizó un radio-inmuno ensayo utilizando el kit comercial COAT-N-COAT® (Siemens) para determinar los niveles de las hormonas estradiol (TKE21, Estradiol) y testosterona (TKTT1, Testosterona total) tanto séricos como intratumorales. El método consiste en un RIA con ^{125}I diseñado para la determinación cuantitativa y en fase solida de estas hormonas. Brevemente, el procedimiento consistió en la utilización de tubos recubiertos con anticuerpos (anti-estradiol o anti-testosterona), en donde la hormona marcada con ^{125}I compite por los sitios de unión al anticuerpo con la hormona presente en la muestra. Luego de la incubación los tubos se cuentan en contador gamma donde la cantidad de cuentas leídas están inversamente relacionada con la cantidad de hormona presente en la muestra. La cantidad de hormona presente en la muestra se determinó comparando las cuentas con una curva de calibración.

Para estas determinaciones se utilizaron los sueros de los xenotransplantes y de los ratones de la cepa C57BL6J alimentados con las dietas control e hipercalórica. Asimismo, también se utilizaron para estas determinaciones fracciones de tejido tumoral extirpado de los xenotransplantes. En este último caso se procedió a la extracción de las hormonas presentes en la muestra por homogenización mecánica en Ultra-turrax del tejido en 500 μl de H_2O bidestilada y posterior extracción utilizando éter etílico, dos extracciones consecutivas en un volumen de 2,5 ml. Finalmente, luego de evaporar el éter utilizado para la extracción, las muestras se resuspendieron en 200 μl de buffer de RIA, presente en cada uno de los kits. Finalmente se siguieron las especificaciones del fabricante para la determinación de los niveles hormonales en los tejidos.

Los resultados en concentraciones se obtuvieron a través de una representación logit-log de la curva de calibración. Se representó el porcentaje de unión en función de la concentración y por interpolación en esta curva se determinaron las concentraciones de las hormonas en la muestra. Para la determinación de Estradiol se estiman concentración en el rango de 0 a 3600 pg/ml, mientras que en el caso de la testosterona total las concentraciones oscilan en el rango de 0 a 1600 ng/dl. Para el caso donde se utilizó tejido tumoral, se estimaron los valores hormonales en función de los mg de tejido.

3.5. Determinación de los niveles de NAD⁺ y NADH.

Se utilizó el kit comercial NAD⁺/NADH assay kit (abcam®) para la determinación de nicotinamida nucleótidos en tejidos provenientes de los tumores extirpados de los xenotransplantes generados con las diferentes líneas celulares de PCa y sometidos a las diferentes dietas, dieta control o hipercalórica. Brevemente, se partió de aproximadamente 20 mg de tejido el cual fue homogenizado manualmente y posteriormente sonificado 2 veces durante 15 segundos a 10 % potencia en hielo, en un sonicador de tip Branson Sonifier Cell Disruptor. Se recolectaron los sobrenadante de cada muestra y posteriormente fueron utilizados para la determinación de NAD⁺ y NADH. Para la determinación de NAD⁺, se sembraron 50 µl del homogenato en placa de 96 pocillos, mientras que para la determinación de NADH, 200 µl de este homogenato fueron incubados a 60°C por 30 minutos, y posteriormente se sembraron 50 µl de este en placa de 96 pocillos. Mediante este procedimiento todo el NAD⁺ presente en la muestra se descompone, manteniéndose intacto el NADH. En paralelo se procedió a la realización de una curva estándar en el rango de 0 a 100 pmol/pocillo. Tanto las muestras como la curva estándar de calibración se incubaron con una mezcla de 100 µl conteniendo el buffer de ciclado y la enzima de ciclado que convierte NAD⁺ hacia NADH, manteniendo reducido así el NADH. Finalmente se agregó solución reveladora y se incubaron las muestras durante 1 a 4 horas realizándose mediciones cada hora en espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. Para el análisis de los datos se graficó la curva de calibración como D.O450nm en función de la concentración de NADH y por extrapolación de las D.O de las muestras se estimó la concentración de NADH. El cálculo de la relación NAD⁺/NADH surge de la siguiente ecuación.

$$\frac{\text{NADt} - \text{NADH}}{\text{NADH}} \quad (15)$$

3.6. Cortes histológicos.

3.6.1. Tinciones especiales

Los tumores subcutáneos fueron removidos, fijados inmediatamente en paraformaldehído 4% (v/v) y procesados para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes sucesivos de 5 µm de espesor, siendo el primero coloreado con la técnica de hematoxilina-eosina; los restantes cortes, en blanco, se utilizaron para la realización de otras técnicas histológicas. Estos ensayos fueron llevados adelante y se realizaron como parte de una colaboración con el Dr. Roberto P. Meiss, Jefe de la División Patología Experimental de la Academia Nacional de Medicina.

3.6.2. Tinciones inmunohistoquímicas (IHQ)

Para la técnica inmunohistoquímica se utilizó el sistema del complejo biotina-estreptavidina- peroxidasa. (LSAB ® + kit, HRP, DAKO). Brevemente, los cortes fueron desparafinados con xileno e hidratados con etanol en concentraciones decrecientes y con agua destilada. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% (v/v) durante 10 min. Se realizaron varios lavados con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 2% (m/v) en PBS durante 20 min. La recuperación de antígenos se llevó a cabo con el sistema de microondas (750W, 3x1 min) en buffer citrato de sodio 10 mM; pH 6. Para estudiar la expresión de CtBP1, ATM y E-caderina se incubaron con el anticuerpo para CtBP1 (BD Biosciences, dilución 1/100-1/250); anticuerpo para ATM (Santa Cruz Biotechnology, dilución 1/50-1/200); o anticuerpo para E-caderina (Mouse anti-E-Cadherin, Clone HECD-1 invitrogen) respectivamente, toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron incubando a las muestras con PBS en ausencia del anticuerpo primario. Luego los cortes se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG biotinilado (DAKO LSAB + Kit, HRP) por 30 min y por último con estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO LSAB + Kit, HRP) por 30 min. La reacción de la peroxidasa con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) (DAKO LSAB + Kit, HRP) formó un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. Se realizó una leve contra-coloración con hematoxilina Mayer's (Zymed Laboratories) al 10% y finalmente los cortes fueron montados con bálsamo, en forma definitiva, para su posterior evaluación. Los preparados fueron evaluados por el Dr. Roberto P. Meiss (Academia Nacional de

Medicina). La evaluación de los resultados se realizó señalando la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de la marcación.

3.7. Análisis estadístico

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar (SD) de “n” experimentos independientes.

Para los ensayos *in vitro* e *in vivo* se realizaron Prueba T con $p < 0,05$ como criterio para la significancia estadística seguido de una prueba de Normalidad (Shapiro-Wilks) y ANOVA.

RESULTADOS

CAPITULO I

La proteína BRCA1 interacciona con co-reguladores transcripcionales y factores de transcripción, como por ejemplo Rb, CtIP, p65/Rel A, Oct-1, ZBRK1, c-Myc, STAT1, p53 y E2F1 (De Siervi et al, 2010; Rosen et al, 2006; Somasundaram, 2003; Wang et al, 2000). En base a esto y considerando que hasta el momento no se conocen secuencias consenso de pegado al ADN para esta proteína, se definió a BRCA1 como un co-regulador de la transcripción. Además, distintos estudios de expresión génica determinaron que BRCA1 modula la transcripción de genes que intervienen en procesos biológicos, tales como la regulación del ciclo celular, la respuesta al daño en el ADN y la apoptosis, entre otros (De Luca et al, 2011; De Siervi et al, 2010; Somasundaram, 2003). Asimismo, como mencionamos previamente, nuestro grupo demostró por primera vez que BRCA1 es capaz de asociarse al promotor de numerosos genes relacionados con la regulación del ciclo celular y la respuesta al daño en el ADN (De Luca et al, 2011; De Siervi et al, 2010).

Otro aspecto a tener en cuenta, es determinar de qué manera BRCA1 participa en la etiología del PCa. Si bien se sabe que mutaciones en el gen de BRCA1 no aumentan el riesgo de desarrollar esta enfermedad, varios trabajos determinaron que estas mutaciones aumentan la agresividad tumoral confiriéndole a los pacientes un peor pronóstico (Douglas et al, 2007; Gallagher et al, 2010). Además, BRCA1 interacciona directamente con el dominio AF-1 del AR induciendo su actividad transcripcional (Park et al, 2000; Yeh et al, 2000). También, nuestro grupo determinó que la disminución de la expresión de BRCA1 aumenta el desarrollo tumoral de próstata *in vivo* (De Luca et al, 2011).

En base a estas evidencias es fácil deducir que BRCA1 podría estar involucrado en diversos procesos celulares a través, fundamentalmente, de su función co-reguladora de la transcripción. Considerando además que aún no se conoce exactamente el rol de ésta proteína en el PCa, en este capítulo nuestro estudio se focalizó en evaluar la co-regulación transcripcional mediada por BRCA1 en genes importantes en la etiología del PCa. Por lo tanto, conociendo que la inestabilidad genómica es un mecanismo que permite acumular alteraciones genéticas que pueden, en ocasiones, resultar favorables al aumentar la proliferación y permitir la evasión de señales de muerte celular a las células tumorales, nuestro primer objetivo fue:

Investigar el rol de BRCA1 en la regulación de la transcripción de genes involucrados en la respuesta al daño en el ADN en el PCa.

1.1. Regulación transcripcional de genes por BRCA1.

A partir de los resultados obtenidos en un análisis de ChIP-chip para BRCA1 realizado previamente (De Siervi et al, 2010), seleccionamos 3 genes involucrados en los procesos de respuesta al daño en el ADN y la regulación del ciclo celular para su estudio. Estos genes son: ATM (ataxia telangectasia mutada), una proteína quinasa que se activa frente al daño en el ADN doble cadena gatillando procesos de reparación y arresto del ciclo celular; DDB2 (damage-specific DNA binding protein 2), una proteína requerida en la reparación del ADN; y MAD2L1 (Mitotic arrest deficient 2-like protein 1), componente del punto de control de ensamblaje de los husos mitóticos que interviene en la progresión de la división celular en la transición metafase-anafase.

Para determinar si la proteína BRCA1 se asocia a los promotores de estos genes aún en líneas tumorales de próstata PC3, realizamos ensayos de ChIP-qPCR utilizando un anticuerpo anti-BRCA1 a partir de células expuestas o no a doxorrubicina, un agente inductor de daño en el ADN. Como se observa a continuación, BRCA1 se asocia a las regiones proximales de los promotores de DDB2, MAD2L1 y ATM en la condición control (Figura 20). Por otro lado, en presencia de doxorrubicina, BRCA1 se libera del promotor de ATM sin embargo, se mantiene asociado a la secuencia promotora de MAD2L1 y de DDB2.

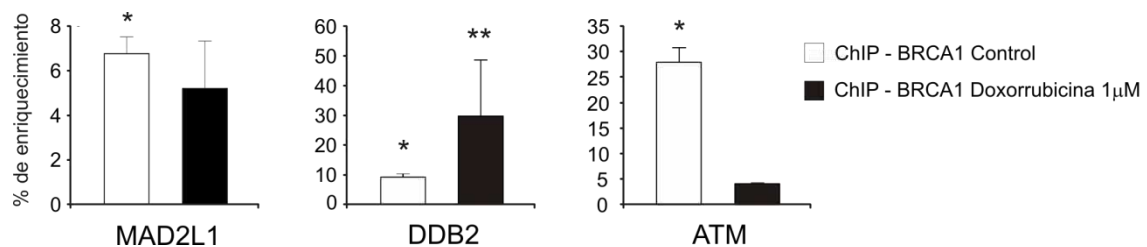


Figura 20. ChIP-qPCR con el anticuerpo anti-BRCA1 o IgG (control no específico) realizado a partir de células PC3 que fueron expuestas a o no a doxorrubicina. Los *primers* fueron diseñados en la región promotora proximal (0 a 500 pb río arriba del TSS) de los promotores de MAD2L1, DDB2 y ATM. Las barras representan el promedio y desvío estándar de dos experimentos independientes. El % de enriquecimiento fue calculado con respecto al input. * = $p < 0,05$.

Para determinar si la proteína BRCA1 además de asociarse a estos promotores, es capaz de regularlos, utilizamos las líneas celulares tumorales de próstata PC3 que tienen aumentada (pcDNA3 BRCA1) o disminuida (shRNA BRCA1) la expresión de BRCA1 en forma estable y sus respectivos controles (pcDNA3 o shRNA scramble) (De Luca et al, 2011). A partir de estas células, aislamos el ARN total y mediante RT-qPCR evaluamos los niveles de expresión de estos genes. Encontramos así que la sobre-expresión de BRCA1 indujo la transcripción de los genes ATM y DDB2, mientras que

la expresión de MAD2L1 no se vió afectada (Figura 21A). Por otro lado, al silenciar la expresión de BRCA1, observamos que los niveles de expresión de 3 genes disminuyeron respecto al control (Figura 21B).

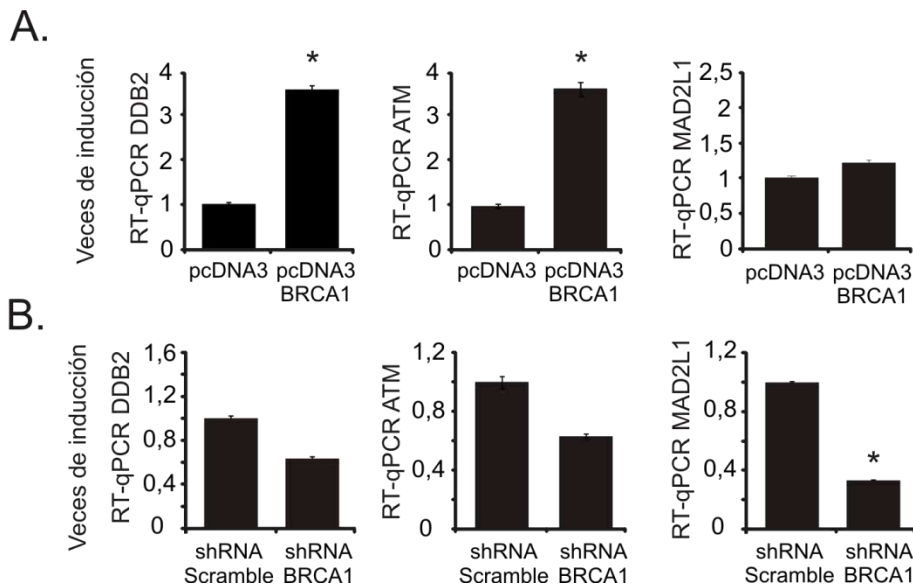


Figura 21. RT-qPCR a partir de células PC3 que tienen: **A)** aumentada, o **B)** disminuida la expresión de BRCA1 en forma estable. Se muestran las veces de inducción de cada uno de los genes evaluados con respecto a Actina β y al control. Las barras representan el promedio y el desvío estándar de 2 experimentos independientes. * = $p < 0,05$.

Estos resultados, junto a los resultados previos de nuestro grupo (De Luca et al, 2011), sugieren que la proteína BRCA1 es capaz de orquestar una respuesta frente al daño en el ADN a través de la modulación de la transcripción de ciertos genes. A continuación nos focalizamos en comprender la regulación transcripcional de ATM por BRCA1 en situaciones de estrés genotóxico.

1.2. El daño en el ADN y co-reguladores de la transcripción modulan la expresión de ATM.

La quinasa ATM es clave en la regulación de la respuesta frente al daño doble cadena de la hebra de ADN (Lavin et al, 2005). Hasta el momento hay mucha información publicada acerca de la función de esta proteína y sus modificaciones post-traduccionales en respuesta a esta vía de señalización (Lavin & Kozlov, 2007), sin embargo se conoce muy poco sobre su regulación transcripcional. Considerando la importancia de ATM en la respuesta al daño en el ADN, nos propusimos investigar la regulación transcripcional de ATM en el PCa. Para ello, transfectamos células PC3 con una amplia variedad de vectores de expresión para diversos factores y co-reguladores de la transcripción tanto ubicuos como específicos para próstata. Luego, aislamos el

ARN de las células transfectadas y mediante RT-qPCR evaluamos los niveles de expresión del ARNm de ATM al sobre-expresar estos factores. De esta manera, encontramos que la sobre-expresión de BRCA1 llevaba a un incremento en los niveles de ARNm de ATM, mientras que la sobre-expresión de cualquiera de los otros factores no afectó significativamente los niveles de ATM (Figura 22).

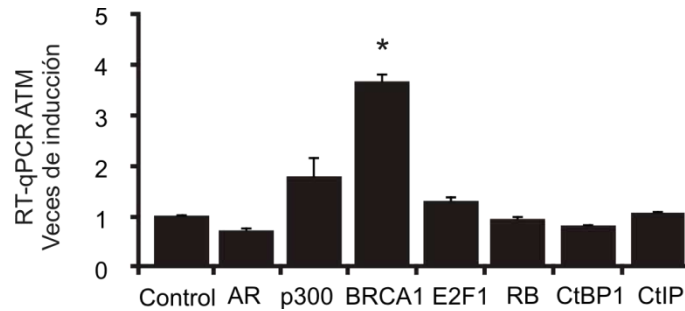


Figura 22. RT-qPCR de células PC3 transfectadas con vectores de expresión para las proteínas p300 (acetiltransferasa de histonas), E2F1 (factor de transcripción involucrado principalmente en la regulación del ciclo celular), RB (*retinoblastoma*, supresor tumoral y represor de la actividad transcripcional de E2F1), CtBP1 (*C-terminal binding protein1*, co-represor de la transcripción), CtIP (*CtBP interacting protein*, supresor tumoral involucrado en la respuesta al daño en el ADN y regulación del ciclo celular) y AR (*receptor de andrógenos*, receptor nuclear de hormonas esteroideas fundamental para el desarrollo de la próstata). Se muestran las veces de inducción respecto a Actina β y al control (pcDNA3). Las barras representan la media de tres experimentos independientes y sus desvíos estándar. * $p < 0,05$.

Dado que la proteína ATM se activa y desencadena su cascada de señalización en respuesta al daño doble cadena en el ADN, consideramos evaluar si es posible que este tipo de estrés pueda modular la expresión de ATM. Para ello, las células PC3 transfectadas con la construcción reportera de ATM (ATM-Luc) fueron expuestas a diferentes agentes genotóxicos y evaluamos la activación transcripcional de ATM como consecuencia de la administración de las drogas. Utilizamos diferentes agentes quimioterapéuticos: doxorrubicina, un potente inhibidor de la enzima topoisomerasa II y agente intercalante que genera ruptura de la hebra de ADN al bloquear la actividad de dicha enzima (Minotti et al, 2004); mitoxantrona, presenta un mecanismo de acción similar al de doxorrubicina ya que también es inhibidor de la enzima topoisomerasa II (Minotti et al, 2004); etopósido, agente inhibidor de la enzima topoisomerasa II e intercalante en la hebra de ADN (Muller et al, 1998); y metotrexato, un antineoplásico que inhibe la actividad de la enzima tetrahidrofolato deshidrogenasa previniendo la formación del tetrahidrofolato necesario para la síntesis de timidina (Muller et al, 1998). Como se muestra en la siguiente figura 23A, tanto la doxorrubicina como su análogo, la mitoxantrona, inhibieron la actividad del promotor de ATM. Sin embargo, la administración de las drogas etopósido o metotrexato en los cultivos celulares no produjo cambios significativos en los niveles de actividad de luciferasa (Figura 23A).

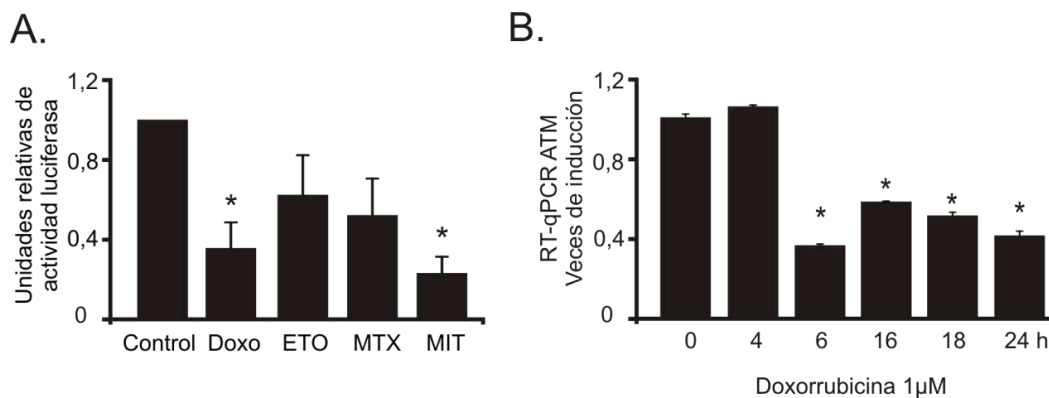


Figura 23. A) Ensayo reportero en células PC3 transfectadas con la construcción ATM-luc. Las células fueron expuestas por 24 h con los diferentes agentes genotóxicos y posteriormente fueron cosechadas y la actividad luciferasa determinada. Los datos se normalizaron respecto al tratamiento control y a la concentración de proteína total. Doxo = Doxorubicina 1 μ M, ETO = Etopósido 5 μ M, MTX = Metotrexato 200 μ M, MIT = Mitoxantrona 1 μ M. **B)** RT-qPCR de células PC3 tratadas con Doxorubicina 1 μ M por los tiempos indicados (0 a 24 h). Los datos fueron normalizados a Actina β y al control (DMSO). Las barras representan el promedio y el desvío estándar de 3 experimentos independientes. * = $p < 0,05$.

Hasta el momento, no había sido reportado en la bibliografía que la transcripción de ATM pueda ser modulada por el daño en el ADN. En este trabajo de tesis, encontramos que la administración de ciertos agentes quimioterapéuticos conduce a la represión transcripcional de ATM. Para evaluar específicamente el efecto de la exposición de doxorubicina sobre los niveles de ARNm de ATM en células PC3, a realizamos ensayos de RT-qPCR a diferentes tiempos de exposición con este agente. La administración de Doxorubicina disminuyó significativamente la expresión de ATM a partir de las 6 h de tratamiento (Figura 23B).

1.3. BRCA1 se asocia al promotor de ATM.

Hasta el momento no han sido identificadas secuencias consenso de unión en el ADN para BRCA1. Sin embargo, su rol como co-regulador de la transcripción no está en duda. Con el objetivo de identificar los sitios de interacción de BRCA1 con la región promotora de ATM, realizamos ensayos de ChIP-scanning en células PC3 expuestas o no a doxorubicina utilizando un anticuerpo específico para BRCA1. El ADN inmunoprecipitado fue analizado por qPCR con *primers* específicos localizados a lo largo de la secuencia promotora de ATM (1 Kb, -0,5 Kb, -1 Kb, -1,5 Kb y -3,5 Kb). Los resultados muestran que BRCA1 se asocia únicamente a la región de -0,5 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) en el promotor de ATM solo en la condición control, mientras que en presencia de doxorubicina no se observa enriquecimiento en ninguna de las regiones analizadas. (Figura 24)

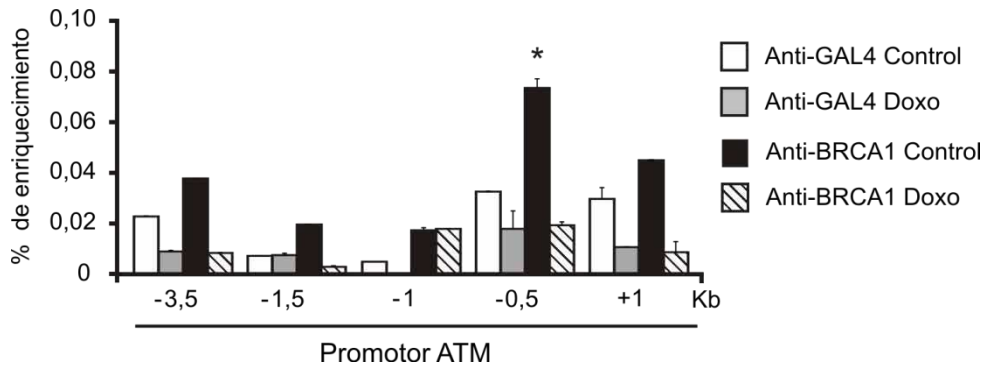


Figura 24. ChIP con anticuerpo específico para BRCA1 en células PC3 expuestas o no a Doxorubicina (Doxo 1 μ M). Los fragmentos de ADN inmunoprecipitados se analizaron por qPCR utilizando *primers* específicos para diferentes regiones del promotor de ATM (3,5 Kb; 1,5 Kb; 1 Kb y 0,5 Kb río arriba de ATM TSS o 1 Kb río abajo de TSS). Se calculó el % de enriquecimiento normalizando los valores de qPCR al Input. * = $p < 0,05$

Considerando estos resultados, decidimos profundizar en el estudio de la secuencia promotora de ATM. Para ello mediante un abordaje bioinformático, utilizando el *software* MatInspector de Genomatix®, analizamos la secuencia del promotor de ATM que comprende los nucleótidos 5 Kb río arriba hasta 1 Kb río abajo del TSS. De esta manera identificamos sitios putativos para diversos factores de transcripción que podrían regular la transcripción de ATM en asociación con BRCA1. En particular, nos concentramos en identificar y estudiar aquellos factores de transcripción de mayor relevancia para el tejido prostático así como aquellos que participen en procesos de regulación del ciclo celular y reparación en el ADN. Es por ello, que de la extensa lista de factores identificados mediante este análisis (1015 sitios posibles de asociación de factores) discriminamos solo aquellos relevantes en nuestra búsqueda. En la tabla 7 se muestran los principales factores identificados en el análisis bioinformático señalando para cada familia de factores (E2F, NFkB, PPAR, ERE, GRE, CREB, AP-1), su secuencia consenso y su posición de asociación con el promotor de ATM.

Tabla 7. Localización y secuencia consenso de los factores de transcripción del promotor de ATM

Familia	Matriz	Secuencia	Posición desde el sitio de inicio de la transcripción			Hebra	Core sim.	Matrix sim.
			Inicial	Final	De anclaje			
V\$AP1F	V\$AP1.02	taatGAGTaacta	-4577	-4565	-4571	+	1	0,907
V\$AP1F	V\$AP1.01	aagtgAGTCagct	-4193	-4181	-4187	-	1	0,991
V\$AP1F	V\$AP1.03	agcTGACtcaact	-4193	-4181	-4187	+	0,971	0,958
V\$AP1F	V\$AP1.02	tcatGAGTaaata	-2211	-2199	-2205	+	1	0,896
V\$AP1F	V\$AP1.02	ggagGAGTcaagg	466	478	472	-	1	0,873
V\$CREB	V\$E4BP4.01	attttttgtGTAaactact	-4691	-4671	-4681	+	1	0,806

V\$CREB	V\$E4BP4.01	ccccgaatagGTAAgaaagta	-4661	-4641	-4651	+	1	0,809
V\$CREB	V\$E4BP4.01	ctttgtttatTTAAaatata	-3930	-3910	-3920	-	0,758	0,845
V\$CREB	V\$CREB2.01	actgtaTGACataaaagcttga	-3747	-3727	-3737	+	1	0,915
V\$CREB	V\$E4BP4.01	acaacattttGTAaAatccca	-2645	-2625	-2635	+	1	0,834
V\$CREB	V\$CREB.02	acctcogaaTGACgaagaatc	-486	-466	-476	+	1	0,89
V\$CREB	V\$TAXCREB.02	tccgaaTGACgaagaatcacc	-483	-463	-473	+	1	0,71
V\$CREB	V\$ATF.01	cggaagTGACgacagttccga	-92	-72	-82	-	1	0,914
V\$CREB	V\$TAXCREB.01	cgtggcTAACgagaaaaagaa	245	265	255	+	0,785	0,816
V\$E2FF	V\$E2F.01	ggaatggggGAAAaata	-3620	-3604	-3612	-	1	0,799
V\$E2FF	V\$E2F.01	ctaaggggaGAAAaactt	-2365	-2349	-2357	+	1	0,782
V\$E2FF	V\$E2F.01	gatttgctaGAAAaaaa	-2293	-2277	-2285	+	1	0,765
V\$E2FF	V\$E2F.01	ggtggcagtGAAAatgg	-1905	-1889	-1897	+	1	0,765
V\$E2FF	V\$E2F.01	ctagggctaGAAAacgt	-976	-960	-968	+	1	0,755
V\$E2FF	V\$E2F.02	gatcagogaAAAAttc	-931	-915	-923	-	0,857	0,867
V\$E2FF	V\$E2F.01	ttgatcagcGAAAaatt	-929	-913	-921	-	1	0,766
V\$E2FF	V\$E2F1_DP2.01	taagGCGggttattag	-795	-779	-787	+	1	0,801
V\$E2FF	V\$E2F3.02	tctgGCGCcttctaa	-782	-766	-774	-	1	0,865
V\$E2FF	V\$E2F3.02	gaaggGCGCaggaagg	-779	-763	-771	+	1	0,93
V\$E2FF	V\$E2F4_DP1.01	accttgGCGcaatttc	-693	-677	-685	-	0,769	0,87
V\$E2FF	V\$E2F4_DP1.01	aaattgCGCCaagggt	-692	-676	-684	+	0,769	0,87
V\$E2FF	V\$RB_E2F1_DP1.01	aattgCCGCgagttcag	-194	-178	-186	-	0,796	0,74
V\$E2FF	V\$E2F4_DP2.01	aactcGCGGcaatttgt	-191	-175	-183	+	1	0,829
V\$E2FF	V\$E2F1_DP1.01	aagaGCGGgacaaaatt	-181	-165	-173	-	1	0,889
V\$E2FF	V\$E2F3.02	tttcgGCGCcttcttt	-131	-115	-123	-	1	0,904
V\$E2FF	V\$E2F3.02	gaaagGCGCogaatga	-128	-112	-120	+	1	0,893
V\$E2FF	V\$E2F1_DP1.01	gaggGCGGgggatgagg	-59	-43	-51	+	1	0,815
V\$E2FF	V\$E2F1_DP2.01	ggagGCGGgggaggaag	-44	-28	-36	+	1	0,797
V\$E2FF	V\$E2F3.01	gaaggGCGAgccgcaaa	15	31	23	+	0,758	0,851
V\$E2FF	V\$E2F.02	acactgcccAAAacat	90	106	98	-	1	0,849
V\$E2FF	V\$E2F.03	tagggGCGCggaggcaa	357	373	365	+	1	0,876
V\$EREF	V\$ER.03	cctggagggcagaatCACccta	-1715	-1693	-1704	-	0,809	0,819
V\$EREF	V\$ER.03	tatgctggacagaagGACCttg	-393	-371	-382	-	1	0,819
V\$EREF	V\$ESRRB.01	tcggaAGGTcaaagtaglatcaa	325	347	336	-	1	0,938
V\$EREF	V\$ER.01	accacagGTCAagattatctcac	798	820	809	-	1	0,854
V\$GREF	V\$ARE.01	gccgtaccttaTGTTgtct	-4334	-4316	-4325	+	1	0,823
V\$GREF	V\$ARE.03	gaagtactgactGTACitg	-2927	-2909	-2918	+	0,853	0,949
V\$GREF	V\$GRE.02	caaGTACagtcagtacttc	-2927	-2909	-2918	-	0,911	0,935
V\$GREF	V\$PRE.01	cacttagttgcTGTTcttc	-2544	-2526	-2535	-	1	0,885
V\$GREF	V\$GRE.02	aaaGAACaatgaattccac	-2528	-2510	-2519	-	1	0,82
V\$GREF	V\$PRE.01	gtggaattcatTGTTcttt	-2528	-2510	-2519	+	1	0,928
V\$GREF	V\$ARE.03	ataagacagaatGTTCigt	-2474	-2456	-2465	+	1	0,95
V\$GREF	V\$GRE.02	acaGAACattctgtcttat	-2474	-2456	-2465	-	1	0,913
V\$GREF	V\$ARE.03	gcgaccagctctGTCCctct	409	427	418	+	0,875	0,877
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB65.01	gcctgagtTTCcttc	-4639	-4625	-4632	+	1	0,873
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB50.01	gttGGGAatcccaaa	-4096	-4082	-4089	+	1	0,851
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB50.01	tttGGGAAttcccaac	-4096	-4082	-4089	-	1	0,906
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB.01	ctGGGAgttcccaaa	-3278	-3264	-3271	-	1	0,961
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB50.01	ttgGGGActcccaga	-3277	-3263	-3270	+	1	0,94
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB.02	ctGGGAtttacaaa	-2638	-2624	-2631	-	1	0,881
V\$NFKB	V\$CREL.01	aatgggtTTCgaa	-1253	-1239	-1246	+	1	0,986
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB.01	taGGGAgttccccgg	-741	-727	-734	-	1	0,985
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB.01	cgGGGAactccctat	-740	-726	-733	+	1	0,947
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB50.01	gagGGGAagcccggag	-559	-545	-552	-	1	0,927
V\$NFKB	V\$NFKAPPAB65.02	ttgggtTTGCctc	-439	-425	-432	-	0,79	0,881

V\$NFKB	V\$NFKAPPAB65.01	gactgaatTTCCcag	390	404	397	-	1	0,882
V\$P53F	V\$P53.02	atcatatttgggaaCATGtcca	-4056	-4034	-4045	+	1	0,96
V\$P53F	V\$P53.03	tgcatccaaactggaCATGttcc	-4045	-4023	-4034	-	1	0,976
V\$P53F	V\$P53.03	cactccctcatcagaCAAGtctt	-3569	-3547	-3558	+	0,922	0,972
V\$P53F	V\$P53.02	attcaaggttcaggtCATGcctg	-2888	-2866	-2877	-	1	0,938
V\$P53F	V\$P53.03	ctcaattcgtttggCATGtctg	-2808	-2786	-2797	+	1	0,96
V\$P53F	V\$P53.02	caaacgcgcctgcgcCATGtcca	53	75	64	-	1	0,93
V\$P53F	V\$P53.01	cgcggaCTTGactagtcatttt	621	643	632	+	0,844	0,742
V\$PPAR	V\$PPARG.01	tatTTGGggaacatgtccagttt	-4052	-4030	-4041	+	0,794	0,683
V\$PPAR	V\$PPARG.01	ataTAGGcaatgtccccaagct	-3722	-3700	-3711	+	1	0,719
V\$PPAR	V\$PPARG.01	agcTTGGggaacattgcctatat	-3722	-3700	-3711	-	0,794	0,71

Tabla 7. Se muestran las principales familias de factores que se asocian al promotor de ATM estudiado por el software MatInspector, Genomatix®. Las distintas matrices incluyen una amplia variedad de factores que pertenecen a cada familia. AP1, *Activating protein 1*; CREB, *cAMP-responsive element binding proteins*; E2F, *E2F activator/cell cycle regulator*; ERE, *Estrogen response elements*; GRE, *Glucocorticoid responsive and related elements*; NFKB, *Nuclear factor kappa B/c-rel*; P53, *p53 tumor suppressor*; PPAR, *peroxisome proliferator activated receptor homodimers*.

1.4. E2F1 se asocia al promotor de ATM.

Uno de los factores de transcripción con mayor frecuencia de sitios de reconocimiento en el promotor de ATM identificados en nuestro análisis bioinformático fue E2F. Cabe destacar que Berkovich y col, demostraron que E2F1 es capaz de regular positivamente la transcripción de ATM (Berkovich & Ginsberg, 2003). Por otro lado, estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que BRCA1 forma parte de un complejo regulatorio de la transcripción de su propio promotor compuesto por E2F1 y Rb (De Siervi et al, 2010). En base a estos antecedentes y de los resultados obtenidos por el análisis bioinformático, decidimos focalizarnos en estudiar el rol de E2F1 en la regulación de la transcripción de ATM.

Para validar los hallazgos obtenidos *in silico*, realizamos un ensayo de CHIP-scanning utilizando un anticuerpo específico para E2F1 en las células PC3 tratadas o no con doxorrubicina. Encontramos que tanto en la condición control como luego de la exposición de las células a la doxorrubicina, la proteína E2F1 se asocia al promotor de ATM en la región de -0,5 Kb, cercana al TSS (Figura 25). Esta misma región fue la que previamente habíamos identificado como sitio de asociación para la proteína BRCA1 (Figura 24).

De acuerdo con lo obtenido por el análisis bioinformático, en las posiciones 36, 51, 173, 186 y 787 pb río arriba del TSS del promotor de ATM existen secuencias consenso para el reconocimiento de E2F1. Teniendo en cuenta que el enriquecimiento observado por el ensayo de CHIP-scanning es específico para la región de -500 pb y no para la región de -1000 pb y dado que el límite de resolución de la técnica de CHIP-qPCR está restringido al tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos luego de ser

sonicados (fragmentos de aproximadamente 500 pb de longitud), podemos concluir que E2F1 se asocia preferencialmente en las posiciones -36, -51, -173 y -186 pb y no en la posición -787 pb.

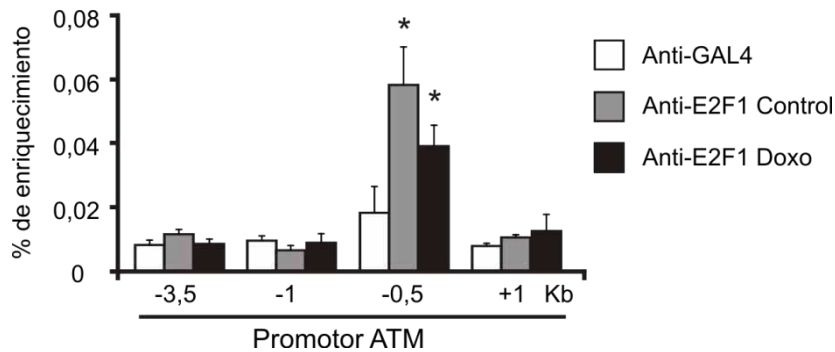


Figura 25. ChIP a partir de células PC3 expuestas o no a Doxorubicina (Doxo 1 μ M) con anticuerpo específico para E2F1 o su control no específico (Gal 4). Los fragmentos de ADN inmunoprecipitados se analizaron por qPCR utilizando *primers* específicos a lo largo del promotor de ATM (3,5 Kb; 1,5 Kb; 1 Kb y 0,5 Kb río arriba de ATM TSS o 1 Kb río abajo de TSS). Se calculó el % de enriquecimiento normalizando los valores de qPCR respecto al Input. * = $p < 0,05$

1.5. Rol de BRCA1 en la regulación de la expresión de ATM.

1.5.1. *BRCA1 induce la transcripción de ATM*

Luego de localizar la asociación de BRCA1 y E2F1 en el promotor de ATM, investigamos el rol de estos factores en la regulación transcripcional de ATM. Para ello, evaluamos en primera instancia los niveles de ARNm de ATM en células PC3 que sobre-expresan (pcDNA3 BRCA1) o tienen silenciada (shRNA BRCA1) la expresión de BRCA1, y sus respectivos controles (pcDNA3 y shRNA scramble) cuando fueron o no expuestas a Doxorubicina (Figura 26A). De esta manera, encontramos que BRCA1 induce la expresión de ATM y que esta inducción disminuye en presencia de Doxorubicina. De la misma manera, observamos que al silenciar la expresión de BRCA1, existe una represión del ARNm de ATM para ambas condiciones, llevando a una disminución significativa de los mismos respecto a la condición control (Figura 26A).

Además, para investigar si BRCA1 induce directamente la actividad del promotor de ATM, transfectamos estas células con la construcción reportera de ATM y expusimos o no a doxorubicina y determinamos la actividad luciferasa resultante. La sobre-expresión de BRCA1, al igual que como ocurre a nivel de ARNm, induce la actividad del promotor de ATM, mientras que su silenciamiento provoca que los niveles de actividad de luciferasa disminuyan (Figura 26B). Además, observamos que el tratamiento con doxorubicina provoca una disminución significativa en los niveles de actividad luciferasa respecto a los controles no expuestos a la droga.

En el extremo C-terminal la proteína BRCA1 presenta dos dominios BRCT (BRCA1 Carboxy-terminal) en tándem cuya función principal es la de trans-activación ya que a través de ésta interacciona con otras proteínas (Rodriguez et al, 2003). Ha sido demostrado que el número de repeticiones de este dominio puede estar alterado en el cáncer afectando la función supresora tumoral de BRCA1 (Rodriguez et al, 2003). Para determinar si la pérdida de los dominios BRCT de la proteína BRCA1 es importante en la regulación transcripcional de ATM, co-transfectamos estas células con un vector de expresión para BRCA1 que carece de los dominios BRCT (pcDNA3 BRCA1 Δ BRCT). Como se muestra en la figura 26B, la inducción de ATM se pierde totalmente en ausencia de este dominio tanto, en presencia o no de doxorubicina.

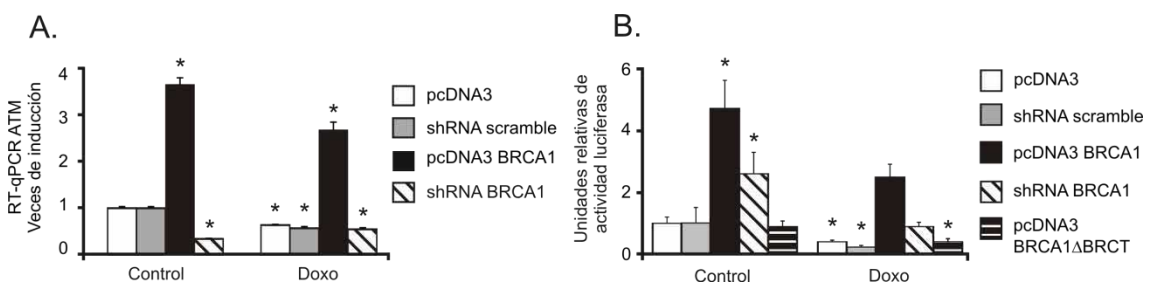


Figura 26. A) RT-qPCR para ATM en células PC3, pcDNA3 BRCA1 o PC3.shRNA BRCA1 y sus respectivos controles (PC3.pcDNA3 y PC3.shRNA scramble). Las células fueron expuestas a Doxorubicina ($1\mu\text{M}$ por 24 h) o control. Se muestra las medias y los desvíos estándar de 3 experimentos independientes donde los datos fueron normalizados con respecto a Actina β y al control. **B)** Ensayo reportero utilizando el vector ATM-luc en células PC3 de expresión estable para BRCA1 (pcDNA BRCA1, shRNA BRCA1, pcDNA3 y shRNA scramble). En paralelo se realizó una transfección transiente de células PC3 con el vector de expresión para BRCA1 que carece de su dominio BRCT en el extremo C-terminal (pcDNA3 Δ BRCT). Luego de 24 h de tratamiento con doxorubicina, las células se cosecharon y se midió la actividad luciferasa. Los datos fueron normalizados a la concentración de proteína total y al control. Las barras representan el promedio y el desvío estándar de 5 réplicas biológicas independientes. * = $p < 0,05$

Estos resultados muestran que la sobre-expresión de BRCA1 induce la transcripción de ATM y que para ello es necesario la presencia del dominio BRCT. Además, observamos que la administración de doxorubicina lleva a una disminución significativa de los niveles de ATM tanto a nivel ARNm como de actividad del promotor.

1.5.2. El daño en el ADN reprime la transcripción de ATM aún en presencia de BRCA1.

Habiendo encontrado que el daño en el ADN ocasionado por diferentes agentes genotóxicos reprime la actividad transcripcional del promotor de ATM en células PC3, y que la sobre-expresión de BRCA1 aumenta los niveles de expresión de ATM, nos propusimos investigar el efecto del daño en el ADN pero en este caso al sobre-

expresar BRCA1. Para ello, tratamos las células PC3.pcDNA3 BRCA1 transfectadas con el vector reportero de ATM, con los diferentes agentes quimioterapéuticos anteriormente utilizados y evaluamos su respuesta frente a estas drogas. El tratamiento con doxorubicina y con mitoxantrona provocó una represión de la actividad del promotor de ATM en las células que sobre-expresan BRCA1, mientras que no se observaron cambios significativos tanto al administrar etopósido como metotrexato (Figura 27).

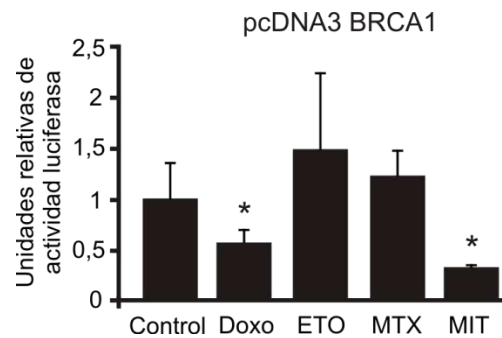


Figura 27. Las células PC3 pcDNA3 BRCA1 fueron transfectadas con la construcción reportera de ATM-luc y tratadas por 24 h con los agentes quimioterapéuticos. Doxo = Doxorubicina 1 μ M; ETO = Etopósido 5 μ M; MTX = Metotrexato 200 μ M; MIT = Mitoxantrona 1 μ M. La actividad luciferasa se determinó luego de cosechar las células. Los datos fueron normalizados a proteína total y control respectivamente. Las barras representan el promedio y el desvío estándar de 3 experimentos independientes. * = $p < 0,05$

1.5.3. ATM regula su expresión a través de una retroalimentación positiva mediado por la fosforilación de BRCA1.

BRCA1 es un blanco específico de fosforilación de ATM en los residuos de serina (S¹³⁸⁷-S¹⁴²³- S¹⁵²⁴) (Gatei et al, 2000). Dado el rol que hemos encontrado en la regulación de la transcripción de ATM por BRCA1, nos propusimos investigar si existe un *loop* regulatorio de ATM sobre su propia transcripción mediado por la fosforilación de BRCA1.

Para ello evaluamos si la administración del agente KU 55933, un inhibidor específico de la actividad quinasa de ATM, en las células que sobre-expresan BRCA1 modifica la actividad del promotor de ATM. Encontramos que la administración de KU 55933 en presencia de BRCA1 disminuye significativamente la actividad del reportero de ATM (Figura 28). Estos resultados sugieren que debido a que el promotor de ATM todavía mantiene cierta actividad transcripcional a pesar del tratamiento con el KU 55933, la regulación transcripcional de ATM por BRCA1 estaría solo en parte mediada por la actividad quinasa de ATM y es posible que otros factores estén involucrados en esta regulación.

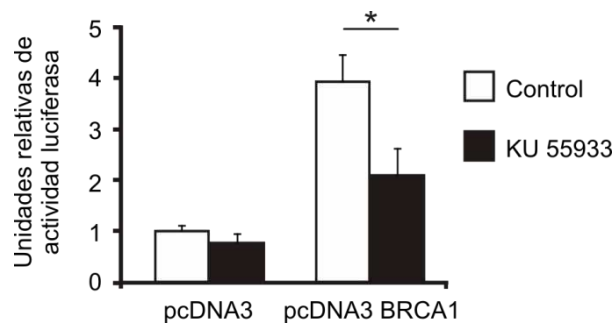


Figura 28. Las células PC3 pcDNA3 BRCA1 y el control (pcDNA3) fueron transfectadas con la construcción reportera de ATM-luc y se expusieron al KU 55933 (5 μ M) o el vehículo (DMSO) durante 24 h. Las células se cosecharon y se midió la actividad luciferasa. Los datos se normalizaron con la concentración de proteína total y al control. Las barras representan el promedio y el desvío estándar de 2 réplicas biológicas independientes. * = $p < 0,05$.

1.5.4. La inducción de la transcripción de ATM mediada por BRCA1 aumenta la actividad de ATM.

Con el objetivo de determinar si la sobre-expresión de BRCA1 es la responsable de estimular no solo la transcripción sino también la función de ATM, determinamos sus niveles proteicos y los de fosforilación de la histona H2AX, uno de los blancos específicos de ATM en respuesta al daño en el ADN. Para ello, la línea celular que sobre-expresa BRCA1 y su control fueron expuestos a doxorubicina y analizados mediante ensayos de Western Blot.

El tratamiento con doxorubicina aumentó significativamente los niveles de fosforilación de la histona (γ H2AX) en ambas líneas celulares observándose un incremento a partir de las 6 h de tratamiento. Por otro lado, observamos que la sobre-expresión de BRCA1 aumentó los niveles de γ H2AX en ausencia de doxorubicina (Figura 29A, calle 1 *versus* 5). Algo muy similar ocurre cuando observamos los niveles proteicos de ATM. En este caso, encontramos que la sobre-expresión de BRCA1 aumenta casi 5 veces los niveles proteicos de ATM respecto a la línea celular control. Sin embargo, el tratamiento con doxorubicina promueve una disminución en los niveles proteicos de ATM en las células que sobre-expresan BRCA1 correlacionando con los resultados anteriormente presentados (Figura 29A).

Para identificar si el incremento observado en la actividad quinasas de ATM por BRCA1 podría deberse a un aumento en la síntesis de proteína, incubamos las células PC3.pcDNA3 BRCA1 con actinomicina D, un potente inhibidor de la transcripción. Los resultados muestran que tanto a las 6 h como a las 24 h, existe una disminución en los niveles proteicos de ATM y un aumento de γ H2AX con el tratamiento con doxorubicina, tal como lo habíamos reportado anteriormente (Figura 29B, calles 2 y

5). Por el contrario, cuando se pre-incubaban las células con actinomicina D, y posteriormente son tratadas con doxorubicina, se observó que tanto los niveles proteicos de ATM, como los de fosforilación de γ H2AX disminuyen respecto al control, así como también se observa que disminuyen respecto a la administración sola de doxorubicina, para ambos tiempos evaluados (Figura 29B, calles 3 y 6 comparadas con calles 1, 2 y 4 panel superior y medio). Por último, cabe destacar que la administración de actinomicina D a las células PC3 pcDNA3 BRCA1, no produjo cambio respecto a los niveles de fosforilación de γ H2AX a las 6 h, aunque sí se vieron afectados los niveles de ATM.

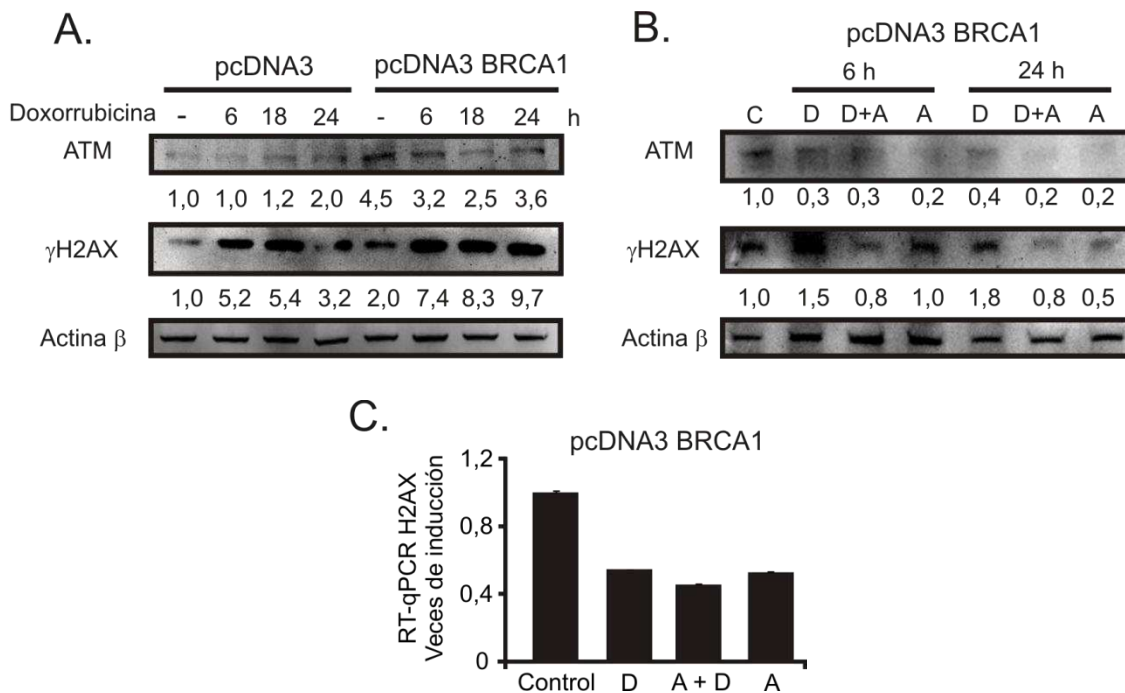


Figura 29. A) Los niveles proteicos de ATM, la histona γ H2AX y Actina β fueron determinados por *Western Blot* en las células PC3 pcDNA3 y PC3 pcDNA3 BRCA1 expuestas a doxorubicina 1 μ M por los tiempos indicados (0; 6; 18; 24 h). **B)** Las células PC3 pcDNA3 BRCA1 fueron pre-tratadas con actinomicina D (5 μ g/ml, 1 h) y luego se las incubó con doxorubicina 1 μ M por los tiempos indicados (0; 6; 24 h). Se aislaron las proteínas totales de cada tratamiento y se determinaron los niveles proteicos para ATM, la fosforilación de H2AX y Actina β mediante ensayos de *Western Blot*. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas y normalizadas a Actina β y al control. Se muestra un experimento representativo de tres réplicas biológicas independientes. **C)** RT-qPCR de células PC3 pcDNA3 BRCA1 tratadas como en B). Se aisló el ARN total de estas células y con *primers* específicos para H2AX se determinaron sus niveles de ARNm en las condiciones mencionadas en B). Los datos fueron normalizados a Actina β y control. (C = Control; A = Actinomicina D; D = Doxorubicina; A+D = Actinomicina D y Doxorubicina.)

Además, para evaluar si los niveles de H2AX total disminuyen por el efecto de la doxorubicina y no debido a la inhibición de la transcripción generada por actinomicina D, evaluamos los niveles de ARNm de H2AX por ensayos de RT-qPCR en células PC3.pcDNA3 BRCA1 que fueron tratadas con doxorubicina, actinomicina D o ambas drogas. Observamos que la actinomicina D inhibió la transcripción de H2AX, de la

misma manera que la doxorrubicina o la combinación de ambas (Figura 29C). Este resultado sugiere que el aumento en los niveles de fosforilación de H2AX por el tratamiento con doxorrubicina no se debe a un incremento de la transcripción de H2AX.

En conclusión, estos resultados sugieren que pese a que la administración de doxorrubicina disminuye los niveles proteicos de ATM, la presencia de BRCA1 promueve un incremento en su actividad quinasa, observado por el aumento en los niveles de fosforilación de γ H2AX aún en ausencia de daño. Más aún, a tiempos cortos y en condiciones donde se ha bloqueado la transcripción por el tratamiento con actinomicina D, los niveles de fosforilación de dicha histona no se modifican. En cambio, los niveles de γ H2AX si se ven afectados cuando además las células son tratadas con doxorrubicina. Estas observaciones, nos estarían indicando que ATM es necesario para la fosforilación de la histona en estas condiciones.

1.6. E2F1 reprime la transcripción de ATM durante la respuesta al daño en el ADN.

Nuestros hallazgos que muestran al factor de transcripción E2F1 asociado al promotor de ATM, sugieren un rol activo para E2F1 en la regulación transcripcional de ATM en células PC3.

Para investigar dicho rol de E2F1 sobre la regulación de la transcripción de ATM, co-transfectamos células PC3 con el plásmido reportero de ATM y los vectores de expresión para E2F1 wt o E2F1 mutantes dominantes negativos: E2F1 E132 (presenta una mutación puntual en el sitio de unión al ADN) y E2F1 Δ 1-363 (carece del dominio de trans-activación). En este caso observamos que la actividad transcripcional del reportero de ATM se ve fuertemente disminuida por la sobre-expresión del factor de transcripción E2F1, mientras que la presencia de los dominantes negativos de E2F1 revierte dicho efecto (Figura 30). Por otro lado, la administración de doxorrubicina, reprime la actividad transcripcional del reportero aún en presencia de las construcciones mutantes de E2F1.

De esta manera, encontramos que E2F1 reprime al promotor de ATM, sin embargo este efecto no se vió reflejado en los niveles de ARNm de ATM. Esta diferencia observada puede deberse a limitaciones en las condiciones experimentales ya que la construcción reportera utilizada contiene solo una región del promotor de ATM y podría ser posible que existan cambios conformacionales en la estructura cromatínica del promotor endógenos de ATM que no podamos representar mediante este ensayo. Sin

embargo, pudimos determinar que E2F1 se encuentra asociado al promotor de ATM, en secuencias que si están representadas en la construcción reportera. De todas formas es interesante resaltar que la presencia de las construcciones mutantes para E2F1 activan la transcripción del reportero, sugiriendo de esta manera, un papel activo de E2F1 en la regulación de ATM.

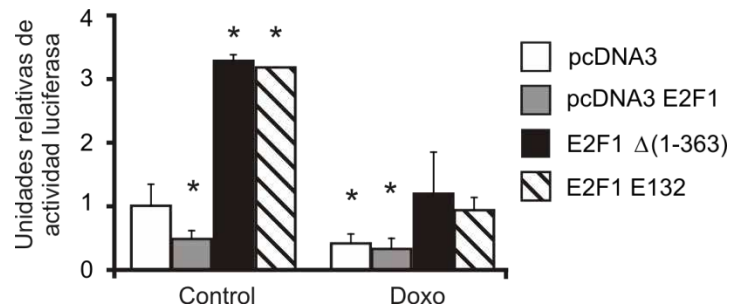


Figura 30. Las células PC3 fueron co-transfectadas con la construcción reportera para ATM y plásmidos de expresión para E2F1 wt o dominantes negativos (E2F1 E132; E2F1 Δ1-363). Las células se expusieron por 24 h a doxorrubicina y posteriormente se midió la actividad luciferasa de las mismas. Las barras representan el promedio y el desvío estándar de 2 experimentos independientes. Los datos se normalizaron a proteína total y respecto a sus controles. * = $p < 0,05$.

1.7. El silenciamiento de la expresión de BRCA1 disminuye la expresión de ATM *in vivo*.

Con el fin de determinar el rol de BRCA1 en la regulación de ATM *in vivo*, previamente desarrollamos en nuestro laboratorio un modelo murino de xenotransplante utilizando células PC3.shRNA scramble o PC3.shRNA BRCA1 (De Luca et al, 2011). Para ello, ratones nude de 6 semanas de edad fueron inoculados con las células estables y a los días 14 y 23 post-inoculación se sometieron a un tratamiento por inyección *i.p.* con doxorrubicina (8 mg/kg/día). Se determinó el volumen tumoral a lo largo de los días y al día 24 post-inoculación, los animales fueron sacrificados, los tumores extirpados y almacenados para su posterior análisis. El tejido tumoral fue utilizado para realizar determinaciones inmunohistoquímicas y extracción de ARN. Los resultados mostraron que la disminución de la expresión de BRCA1 aumentó significativamente el desarrollo tumoral respecto a los individuos controles (De Luca et al, 2011) (Figura 31A). En este trabajo de tesis, utilizamos el ARN extraído de los tumores, y evaluamos los niveles de ARNm para ATM. En este caso podemos observar que existe una disminución en los niveles de ARNm en los tumores de los animales inoculados con células PC3.shRNA BRCA1, y además, que el tratamiento con doxorrubicina acentúa aún más esta represión (Figura 31B). Por último, los cortes histológicos provenientes de los diferentes grupos fueron teñidos utilizando un anticuerpo específico para ATM. En los mismos se observa una disminución de la marcación positiva para aquellos cortes provenientes de los tumores generados por

las células PC3.shRNA BRCA1, tanto en situación control como en aquellos tratados con doxorubicina (Figura 31C).

Estos hallazgos *in vivo* son consistentes con los obtenidos en las líneas celulares, fortaleciendo aún más el rol de BRCA1 y su efecto en la regulación de ATM.

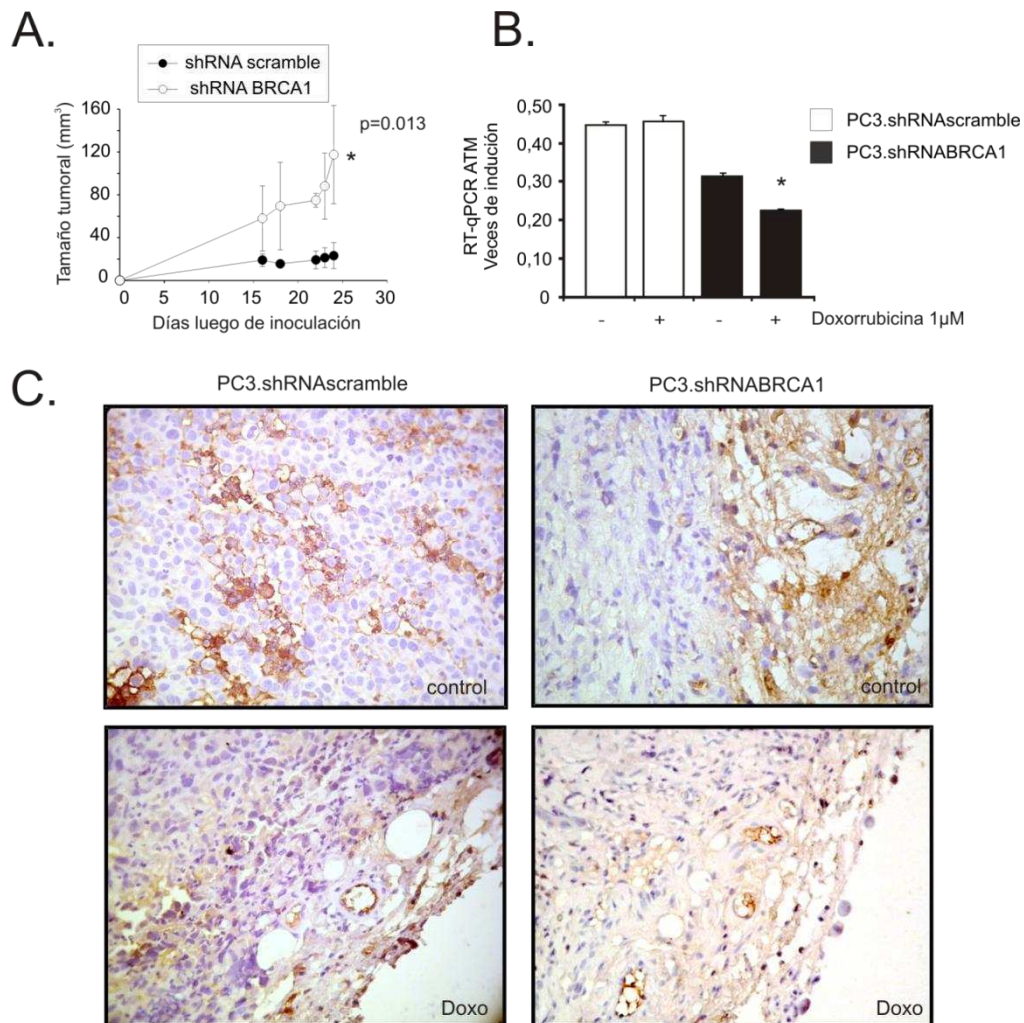


Figura 31. A) Ratones nude ($n=10$) se inocularon con $4,8 \times 10^6$ células PC3 (shRNA scramble o shRNA BRCA1) por vía s.c. Se determinó el volumen tumoral cada 2 días durante 24 días, utilizando la fórmula: $0,523 \times \text{Ancho}^2 \times \text{Largo}$. * = $p < 0,001$. **B)** A los días 14 y 23 post-inoculación se sometieron a un tratamiento por inyección *i.p.* con doxorubicina (8 mg/kg/día). Al día 25, los animales fueron sacrificados, los tumores extirpados y analizados por RT-qPCR. Se determinaron los niveles de expresión para ATM en los tratamientos indicados. Los datos se normalizaron a Actina β para cada individuo y se graficó la media y sus desvíos estándar. * = $p < 0,05$. **C)** Tinciones inmuno-histoquímicas contra ATM para cortes de tumores generados por inoculación de los diferentes tipos celulares en los ratones nude.

1.8. CtIP se asocia al promotor de ATM

Previamente ha sido reportado que el promotor del gen ZBRK1 contiene secuencias específicas de reconocimiento para E2F1. En estos sitios se asocia este factor de transcripción formando un complejo junto con las proteínas remodeladoras

de la cromatina CtIP y CtBP1, y en conjunto reprimen la transcripción de ZBRK1 (Liao et al, 2010). Además, es sabido que BRCA1 interacciona con la proteína CtIP (Yu et al, 1998). En base a esto, nos propusimos investigar el rol de CtIP en la regulación transcripcional de ATM.

Para ello, estudiamos la capacidad de CtIP de asociarse al promotor de ATM mediante ensayos de ChIP-qPCR. Los resultados obtenidos mostraron que CtIP se asocia a la región de -0,5 Kb del promotor de ATM en la condición control y, luego del tratamiento con doxorubicina se libera (Figura 32).

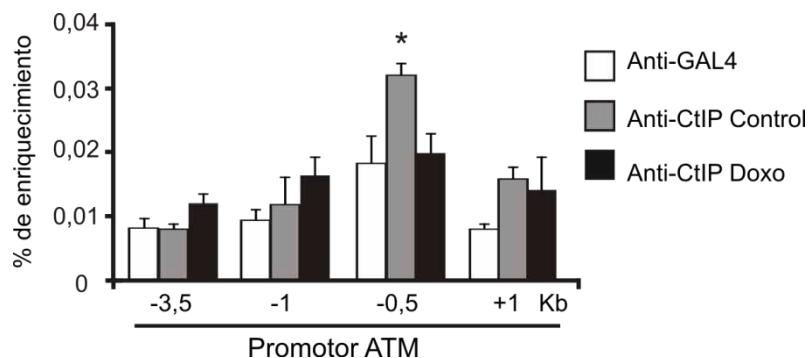


Figura 32. ChIP en células PC3 expuestas o no a doxorubicina (Doxo 1 μ M) con anticuerpo específico para CtIP o su control no específico (Gal 4). Los fragmentos de ADN inmunoprecipitados se analizaron por qPCR utilizando *primers* específicos a lo largo del promotor de ATM (3,5 Kb, 1,5 Kb, 1 Kb and 0,5 Kb río arriba de ATM TSS o 1 Kb río abajo de TSS). Se calculó el porcentaje de enriquecimiento normalizando los valores de qPCR respecto al Input. * = $p < 0,05$

1.9. CtIP induce la transcripción de ATM.

Para determinar si CtIP, además de asociarse al promotor de ATM lo regula, co-transfectamos las células PC3 con el plásmido ATM-luc y con los vectores de expresión para CtIP *wt* o mutantes CtIP DC (carece del sitio de interacción con la proteína y co-represor CtBP1) y CtIP EK (no presenta región de interacción con la proteína Rb). Observamos que la sobre-expresión de CtIP aumenta la actividad del promotor de ATM ya sea en presencia de CtIP *wt* o de las construcciones mutantes (Figura 33). Además, la administración de doxorubicina reprime la actividad del promotor de ATM en presencia de todas las condiciones de expresión de CtIP. Estos resultados indican en primer lugar que CtIP participa de la inducción de la transcripción de ATM. En segundo lugar, que esta inducción es independiente de Rb y CtBP1, ya que los plásmidos mutantes inducen la transcripción de ATM de la misma manera que CtIP *wt*. Finalmente, basándonos en los resultados obtenidos por el ChIP-qPCR, CtIP se asocia al promotor de ATM induciendo su transcripción y luego del tratamiento con doxorubicina se libera, desencadenando su represión.

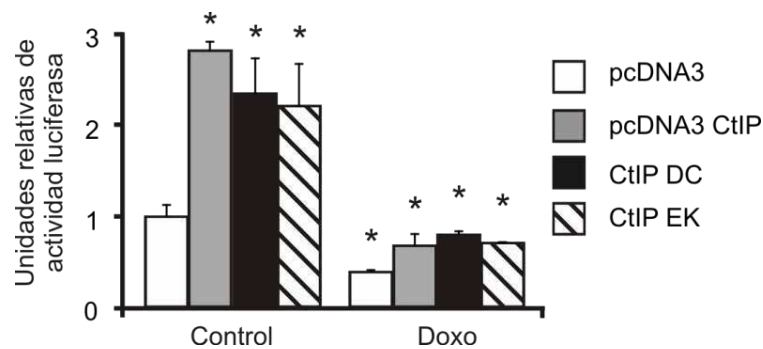


Figura 33. Las células PC3 fueron co-transfectadas con el plásmido de ATM-luc y los plásmidos de expresión para CtIP *wt* o mutantes (CtIP DC; CtIP EK). Las células se expusieron a doxorubicina (1 μ M, 24 h) y posteriormente se midió la actividad luciferasa de las mismas. Las barras representan el promedio y los desvíos estándar de 2 experimentos independientes. Los datos se normalizaron a proteína total y al control. * = $p < 0,05$.

1.10. Conclusiones.

Los resultados presentados en este capítulo de la tesis muestran que la región proximal del promotor de ATM contiene sitios de pegado para E2F1 a los cuales se asocia esta proteína manteniéndose unido a dicha secuencia luego del tratamiento con doxorubicina. De esta manera E2F1 podría actuar como una plataforma para el reclutamiento de otros factores, como por ejemplo BRCA1 y CtIP activando la transcripción de ATM. Sin embargo, luego de la exposición a doxorubicina, BRCA1 y CtIP se liberan manteniéndose solamente E2F1 reclutado reprimiendo la transcripción de ATM.

Además, observamos que el efecto de la sobre-expresión de BRCA1 no solo promueve un incremento en la transcripción de ATM, sino que se correlaciona con un aumento en sus niveles proteicos y de actividad aún en ausencia de daño en el ADN. Más aún, identificamos que el extremo C-terminal de BRCA1 que presenta los dominios BRCT es fundamental para que dicha regulación se lleve adelante.

En base a nuestros resultados proponemos un modelo de regulación transcripcional de ATM que se encuentra esquematizado en la siguiente figura (Figura 34).

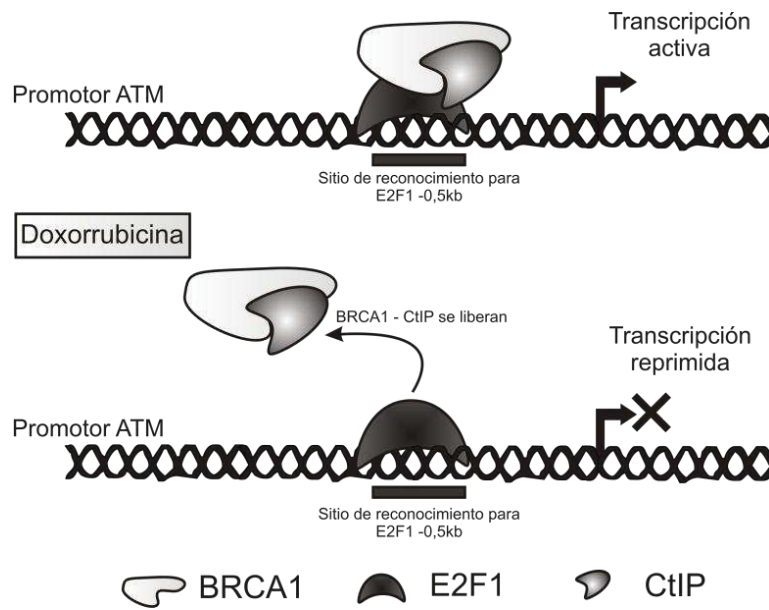


Figura 34. Representación esquemática de la regulación transcripcional de ATM por BRCA1, E2F1 y CtIP.

CAPITULO II

Numerosas evidencias demuestran que mutaciones germinales del gen BRCA1 se correlacionan con una mayor agresividad de los tumores de próstata (Douglas et al, 2007; Gallagher et al, 2010). Sin embargo, no se conoce exactamente cuál es el rol de esta proteína en dicha enfermedad ya que la mayoría de los trabajos publicados se refieren al rol supresor tumoral de esta proteína en el cáncer de mama. En el capítulo anterior estudiamos el rol co-regulador de la transcripción de BRCA1 en la respuesta al daño en el ADN. En este capítulo, nuestro análisis estará focalizado en la influencia de algunos factores de riesgo del PCa sobre la regulación transcripcional de BRCA1 y su rol supresor tumoral.

Previamente, nuestro grupo en colaboración con el grupo del Dr. Kevin Gardner (NCI-NIH) reportó que CtBP1 actúa como un interruptor molecular que controla la transcripción de BRCA1 en respuesta al estado metabólico celular (Di et al, 2010). En ese trabajo se demostró que los estrógenos o el aumento de la relación $NAD^+/NADH$ promueven la liberación de CtBP1 del promotor de BRCA1 activando su transcripción. Asimismo, la baja relación $NAD^+/NADH$, que proviene de la activación persistente de la glucólisis, activa la unión de CtBP1 al promotor de BRCA1 lo cual “apagaría” su función supresora tumoral.

En base a estos antecedentes nos propusimos los siguientes objetivos:

- I. Investigar el efecto de las hormonas (andrógenos y estrógenos) sobre la regulación transcripcional de BRCA1 en células de PCa.**
- II. Estudiar la influencia de la dieta hipercalórica (similar a una baja relación $NAD^+/NADH$) sobre el desarrollo tumoral de próstata.**

2.1. Efecto de las hormonas (andrógenos y estrógenos) sobre la regulación transcripcional de BRCA1 en células de PCa.

2.1.1. Las líneas tumorales de próstata presentan distintos niveles de expresión de BRCA1.

En primer lugar determinamos la expresión de BRCA1 y sus niveles proteicos, en líneas celulares de PCa. Las líneas celulares utilizadas presentan diferentes características en cuanto a la expresión de marcadores de progresión de PCa y de la expresión y respuesta a estímulos hormonales. La línea celular LNCaP es sensible a andrógenos, y expresan AR, PSA y p53 (Horoszewicz et al, 1983). La línea celular C4-2, derivada de LNCaP, muestra características similares a la de su parental, aunque es insensible a la estimulación por andrógenos (Wu et al, 1994). La línea 22Rv1, obtenida a partir de una xenotransplante de carcinoma prostático primario en ratones castrados, es insensible a andrógenos y expresa AR y PSA (Sramkoski et al, 1999). Finalmente la línea celular PC3, no expresa AR, PSA y p53 y es insensible a la estimulación con andrógenos (Kaighn et al, 1979).

De esta manera, mediante RT-qPCR determinamos que las células LNCaP presentan la mayor expresión de BRCA1 dentro de las líneas tumorales de próstata evaluadas, mientras que las células PC3 son las que exhiben los niveles más bajos de expresión (Figura 35A). Las líneas celulares C4-2 y 22Rv1 muestran niveles similares de expresión del ARNm de BRCA1; sin embargo, a nivel proteico, se observan mayores niveles de proteína de BRCA1 en las células C4-2 (Figura 35B). Los resultados del western blot de las líneas celulares de próstata corresponden al trabajo de tesis doctoral de la Dra. Paola De Luca (FCEN – UBA), gentilmente cedido para ser presentados como material adicional a los resultados de expresión por RT-qPCR.

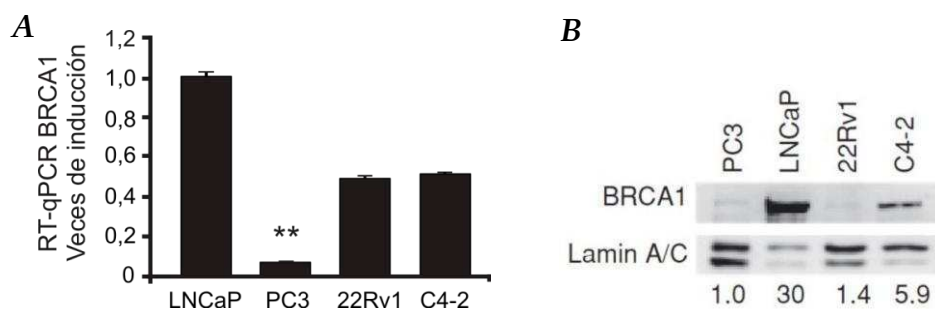


Figura 35. Expresión de BRCA1 en líneas celulares de PCa. **A)** RT-qPCR a partir de ARN total extraído de las líneas celulares indicadas utilizando *primers* específicos para BRCA1. Los niveles de ARNm fueron relativizados a Actina β y normalizados a LNCaP para su comparación. **B)** Extractos de proteínas totales de las líneas celulares de PCa se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra la proteína BRCA1 y Laminina A/C. Los números debajo de las bandas muestran la cuantificación de los niveles de expresión de BRCA1 realizado con el software Image J, relativizado a los niveles de expresión de laminina A/C y al valor de expresión de PC3. ** $p < 0,01$.

2.1.2. La testosterona regula la transcripción de BRCA1 en líneas celulares de PCa.

La expresión de BRCA1 está influenciada por una amplia variedad de estímulos, y ha sido demostrado que en células tumorales de mama, los estrógenos inducen su transcripción (Spillman & Bowcock, 1996). Resultados previos obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Gardner (NCI-NIH) demostraron que los estrógenos actúan sobre el promotor de BRCA1 estimulando su expresión al desplazar un complejo multiproteico que mantiene reprimida la expresión de BRCA1 como respuesta al estado metabólico celular (Di et al, 2010). En base a esto, nos propusimos evaluar el efecto de los andrógenos en la regulación de la transcripción de BRCA1 en las líneas celulares de PCa.

Para ello expusimos las células LNCaP con distintas concentraciones de testosterona y evaluamos los niveles de ARNm de BRCA1 procesados (maduros) y sin procesar (pre-ARNm o inmaduros) (Figura 36A), y los niveles de actividad del promotor de BRCA1 (Figura 36B). De esta manera encontramos que las concentraciones de testosterona mayores a 0,1 μM disminuyen significativamente los niveles de ARNm de BRCA1. Además, luego de transfectar estas células con un plásmido reportero del promotor de BRCA1 (pGL12) observamos que la concentración de 10 μM de testosterona inhibió la actividad del promotor de BRCA1.

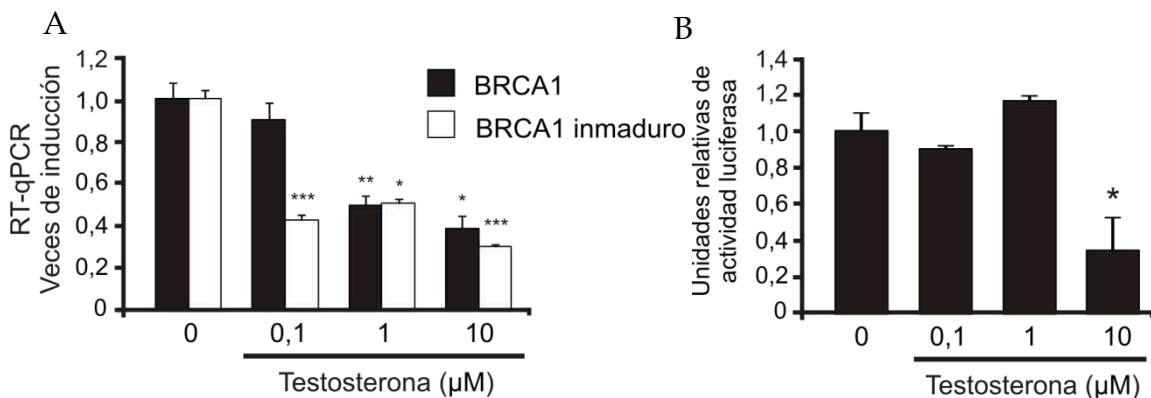


Figura 36. Efecto de la testosterona sobre la transcripción de BRCA1 en la línea celular LNCaP. A) RT-qPCR a partir de células LNCaP utilizando *primers* específicos para los ARNm de BRCA1 procesados o sin procesar luego de la estimulación con las concentraciones indicadas de testosterona (0; 0,1; 1; 10 μM) durante 24 h. Se muestra la media de 2 experimentos independientes y sus desviaciones estándar. **B)** Ensayo reportero en células LNCaP transfectadas con la construcción pGL12 que contiene el promotor de BRCA1 clonado río arriba del gen de la luciferasa. Las células se incubaron durante 24 h con distintas concentraciones de testosterona (0; 0,1; 1; 10 μM) y se determinó la actividad de luciferasa. Las barras representan la media y el desvío estándar de los triplicados de un experimento representativo. Los datos fueron relativizados a proteínas totales y relativizados a la condición control para su comparación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para profundizar en el mecanismo de regulación transcripcional de BRCA1 por testosterona utilizamos la línea celular PC3 que es insensible a la estimulación por

andrógenos. Mediante RT-qPCR encontramos que la testosterona induce la expresión de BRCA1 en células PC3 a una concentración de 10 μM (Figura 37), en contraposición a lo observado en las células LNCaP. Además, al transfectar estas células con un vector de expresión para AR constitutivamente activo (AR5), observamos que las ambas concentraciones de testosterona evaluadas indujeron la expresión de BRCA1.

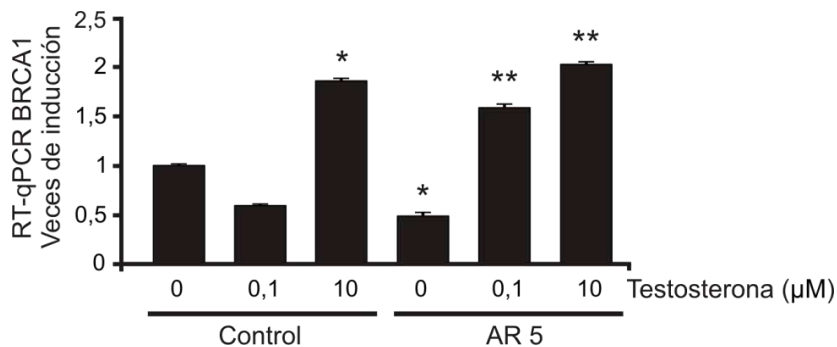


Figura 37. Efecto de la testosterona sobre la regulación transcripcional de BRCA1 en la línea celular PC3. RT-qPCR a partir de células PC3 transfectadas con el plásmido de expresión para el receptor de andrógenos (AR5) que presenta una mutación que lo mantiene activado constitutivamente aún en ausencia de ligando o el vector vacío pcDNA3 (control). Posteriormente las células fueron tratadas con las concentraciones de testosterona que se indican en la figura durante 24 h. Las barras representan la media y el desvío estándar de 2 réplicas independientes. Se muestra un experimento representativo* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

2.1.3. La regulación de la expresión de BRCA1 por testosterona es mediada por su conversión a estrógenos en células PC3 pero no en células LNCaP.

Las células de la próstata metabolizan la testosterona a través de la enzima 5α -reductasa a dihidrotestosterona (DHT), un ligando mucho más eficiente y afín por el AR. Sin embargo, en estas células la testosterona también puede ser convertida a estrógenos por la actividad de la enzima aromatasa (citocromo P450 19A1). Las células de la próstata expresan ER- α y ER- β , indicando que las vías de señalización desencadenadas por los estrógenos también resultan relevantes en los mecanismos de regulación de las células de próstata.

Considerando el efecto opuesto que presenta la estimulación con testosterona sobre la regulación de BRCA1 en líneas celulares sensibles (LNCaP) o insensibles (PC3) a andrógenos, decidimos evaluar si este efecto se debía a la actividad *per se* del AR, a la testosterona o a un producto del metabolismo de esta última. Para ello, mediante RT-qPCR determinamos los niveles de ARNm de BRCA1 en células LNCaP

y PC3 tratadas o no con testosterona y en presencia o ausencia de letrozole, un inhibidor específico de la enzima aromatasa.

Como se observa en la Figura 38A, nuevamente la estimulación con testosterona (10 μ M) reprimió la transcripción de BRCA1 en las células LNCaP. Sin embargo, el tratamiento con letrozole en combinación con testosterona, no modificó esta represión (Figura 38A). Por otro lado, en las células PC3, la estimulación con testosterona indujo significativamente la expresión de BRCA1. Sin embargo, el tratamiento con letrozole y testosterona eliminó esta inducción (Figura 38B).

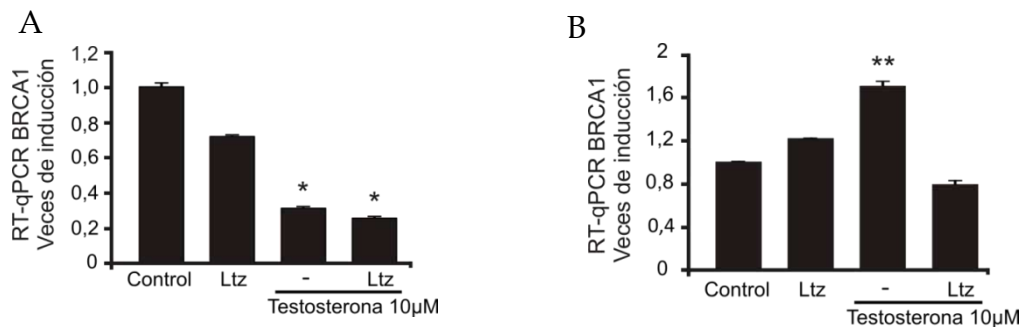


Figura 38. Regulación transcripcional de BRCA1 por andrógenos. RT-qPCR A) en células LNCaP o B) en células PC3, tratadas con testosterona 10 μ M por 24 h o pre-tratadas por 1 h con el inhibidor de la enzima aromatasa, Letrozole (5 μ M). Se muestra la media y desvíos estándar de 2 experimentos independientes. * p < 0,05; ** p < 0,01

En resumen, estos resultados sugieren que la testosterona regula de manera diferente la transcripción de BRCA1 según el tipo celular. En células sensibles a andrógenos, la testosterona estaría reprimiendo a BRCA1 probablemente por un mecanismo mediado por la presencia de AR activo. Además, este efecto es independiente de la conversión de testosterona a estrógenos, probablemente debido a la baja expresión de aromatasa previamente reportada de la línea celular LNCaP (Ellem et al, 2004). Sin embargo, en células insensibles a andrógenos, aún restituyendo la expresión y actividad del AR, la testosterona sería convertida a estrógenos lo cual produce un aumento en los niveles de ARNm de BRCA1. Por lo tanto, la diferencia observada en la regulación de BRCA1 en las dos líneas celulares de PCa podría explicarse no solo por la presencia del AR, sino que además por la manera de metabolizar los andrógenos en estas células.

2.1.4. BRCA1 y CtBP1 se asocian al promotor de BRCA1.

Con el fin de determinar el rol de los andrógenos en la regulación transcripcional de BRCA1, y teniendo como antecedentes los resultados de nuestro grupo de trabajo donde encontramos que BRCA1 se asocia a su propio promotor reprimiéndolo en

células PC3 (De Siervi et al, 2010), y los del grupo del Dr. Gardner donde se mostraba que BRCA1, CtBP1 y varias proteínas modificadoras de histonas también reprimían su expresión (Di et al, 2010), evaluamos mediante ensayos de ChIP la asociación de BRCA1 y CtBP1 al promotor de BRCA1 en presencia o ausencia de testosterona. Como se observa en el ensayo de ChIP, con el anticuerpo anti- BRCA1 y -CtBP1, ambas proteínas se asocian a las secuencias cercanas al TSS (-0,4 y 0 kb) de BRCA1 en la condición control y luego de la estimulación con testosterona estos factores se liberan.

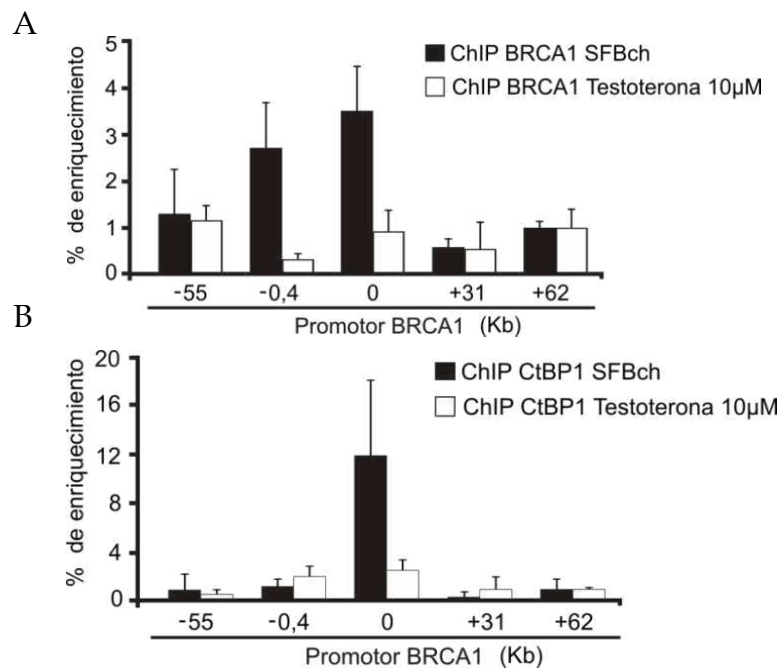


Figura 39. Asociación de factores en el promotor de BRCA1. ChIP con anticuerpo específico para A) BRCA1 o B) CtBP1; en células PC3 expuestas o no a testosterona (10 µM). Los fragmentos de ADN inmunoprecipitados se analizaron por qPCR utilizando *primers* específicos para las regiones del promotor de BRCA1 (55 Kb y 0,4 Kb río arriba del TSS, en el TSS (0 kb) y 31 Kb o 62 Kb río abajo de TSS). Se calculó el % de enriquecimiento para cada uno de los factores, normalizando los valores de qPCR al Input y al inmunoprecipitado no específico (IgG).

En conclusión, en líneas celulares insensibles a andrógenos las proteínas BRCA1 y CtBP1 se encuentran asociadas al promotor de BRCA1 reprimiéndolo, sin embargo en presencia de testosterona, estos co-reguladores se liberan induciendo la transcripción de BRCA1.

2.2. Estudiar la influencia de la dieta hipercalórica (similar a una baja relación $NAD^+/NADH$) sobre el desarrollo tumoral de próstata.

CtBP1, es un factor de transcripción que actúa como represor transcripcional de varios genes (Chinnadurai, 2009). La unión de CtBP1 al NAD^+ o al $NADH$ promueve su dimerización y posterior activación (Chinnadurai, 2009), por lo que se lo conoce como un sensor molecular del estado metabólico de las células. De esta manera ha sido asociado en la regulación de la transcripción de BRCA1 en líneas celulares de cáncer de mama (Di et al, 2010). Nuestros resultados indicaron que CtBP1 también se asocia al promotor de BRCA1 en células de PCa (Figura 39B).

Además, como producto de la activación persistente de la glucólisis, las células cancerosas producen altas concentraciones de $NADH$ (efecto Warburg). En este contexto, nuestra hipótesis es que un aumento en la actividad de CtBP1 que surge de la baja relación $NAD^+/NADH$, resultaría en un aumento en el desarrollo tumoral a través de la regulación de BRCA1.

Por lo tanto para llevar adelante nuestro próximo objetivo, en primera instancia generamos y caracterizamos las líneas celulares de PCa que presentan sobre-expresión (PC3.pcDNA3 CtBP1) o expresión disminuida de CtBP1 (PC3.shRNA CtBP1), para luego generar un modelo murino de obesidad y estudiar el desarrollo tumoral modulando la expresión de CtBP1 en el contexto de una dieta hipercalórica.

2.2.1. Generación de líneas celulares de PCa con expresión estable de distintos niveles de CtBP1.

En primer lugar determinamos la expresión de CtBP1 en las líneas celulares de PCa LNCaP, PC3, 22Rv1 y C4-2. De esta manera, mediante RT-qPCR encontramos que la expresión de CtBP1 es un 80% mayor en la línea celular sensible a andrógenos LNCaP, comparada con las otras líneas celulares analizadas (Figura 40).

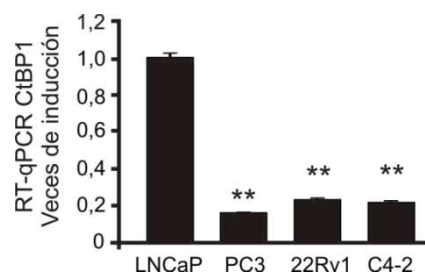


Figura 40. Expresión de CtBP1 en líneas celulares de PCa. RT-qPCR para CtBP1 a partir de ARN total extraído de las diferentes líneas celulares de PCa. Los niveles de ARNm fueron relativizados a Actina β y normalizados a LNCaP para su comparación. Se muestra la media y el desvío estándar de un experimento representativo. ** $p < 0,01$

Considerando el perfil de expresión para CtBP1 de las diferentes líneas celulares, optamos por generar dos nuevas líneas celulares que tengan modulada de manera estable la expresión de CtBP1 en las células PC3. La elección se basó en que las células PC3 son las que presentan menor expresión endógena de CtBP1 y además son insensibles a la estimulación por andrógenos. De esta manera, tal como se indica en la sección de materiales y métodos, generamos las líneas celulares que sobre-expresan CtBP1 (PC3.pcDNA. CtBP1); las que tienen silenciada su expresión (PC3.shRNA CtBP1) y la línea celular control que presenta el vector vacío pGIPZ (PC3.pGIPZ).

Para caracterizar estas líneas celulares, en primera instancia determinamos los niveles de expresión de CtBP1 a nivel de ARNm y sus niveles proteicos. Para ello, mediante RT-qPCR comprobamos que las células PC3.CtBP1 presentan un incremento de 2,5 veces de los niveles de ARNm de CtBP1 respecto a la línea celular control (PC3.pGIPZ), mientras que las células PC3.shCtBP1 mostraron una reducción del 60% (Figura 41A). A nivel proteico se observaron resultados similares para los niveles de CtBP1 en las células PC3 generadas (Figura 41B).

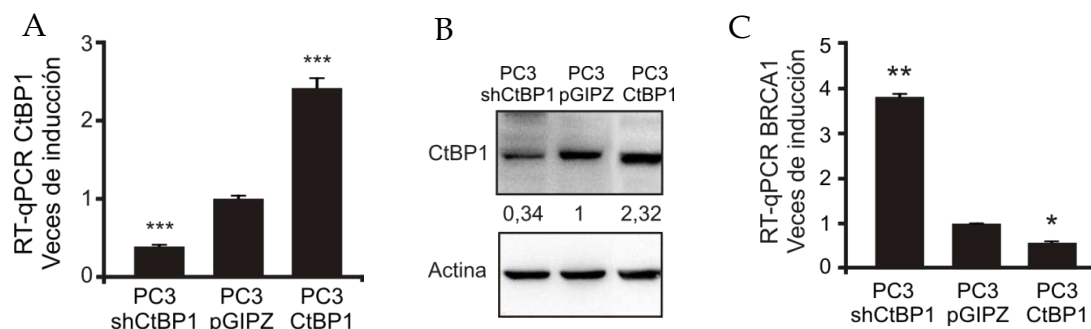


Figura 41. Expresión de CtBP1 y BRCA1 en las líneas celulares de PCa generadas. **A)** RT-qPCR para CtBP1 a partir de ARN total extraído de las diferentes líneas celulares generadas. Los niveles de ARNm fueron relativizados a Actina β y normalizados a PC3.pGIPZ para su comparación. Se muestra la media y desvío estándar de un experimento. **B)** Extractos de proteínas totales de las líneas celulares de PCa generadas y analizadas por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra la proteína CtBP1 y Actina β . Los números debajo de las bandas representan la cuantificación de los niveles de expresión de BRCA1 realizado con el software Image J, relativizado con los niveles de expresión de actina β y control. **C)** RT-qPCR para BRCA1 en las mismas condiciones descritas en A). Se evaluaron 12 clones de células obtenidas a partir de la transfección estable y se muestra sólo el clon 8 que resultó ser el óptimo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Debido a que previamente se demostró que CtBP1 reprime la transcripción de BRCA1 en células tumorales de mama (Di et al, 2010), evaluamos los niveles de expresión de BRCA1 en las líneas celulares estables desarrolladas mediante RT-qPCR. De esta manera observamos como la sobre-expresión de CtBP1 provocó una disminución significativa de los niveles de ARNm de BRCA1 en aproximadamente un

40%, mientras que el silenciamiento de CtBP1 aumentó su transcripción (4 veces) con respecto a las células control (Figura 41C).

2.2.2. La sobre-expresión de CtBP1 aumenta la capacidad de transformar células *in vitro*.

Para determinar el rol de CtBP1 en el proceso de transformación celular, realizamos un ensayo de formación de focos a partir de células pre-transformadas NIH 3T3. Para ello transfectamos estas células con diferentes concentraciones del vector de expresión de CtBP1 como se indica en la figura 42, y al cabo de aproximadamente 2 semanas de crecimiento en cultivo, las células fueron fijadas, teñidas y el número de focos de células transformadas cuantificado mediante la utilización del software GelPro Analyzer 4.0. Los resultados indicaron que el número de focos formados se incrementó de manera dependiente de la masa de plásmido de CtBP1 transfectada en las células NIH 3T3, así como también pudimos determinar que los focos formados presentaban un tamaño mayor (Figura 42).

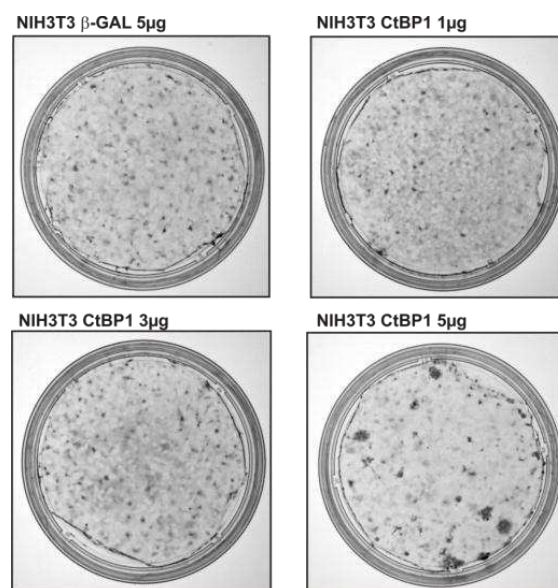


Figura 42. Transformación de células NIH3T3 por sobre-expresión de CtBP1. Ensayo de formación de focos en células pre-transformadas NIH3T3 luego de ser transfectadas por medio de la técnica de fosfato de calcio con concentraciones variables del plásmido de expresión para CtBP1 (1; 3 y 5 μg). Se utilizó el perímetro y área de las colonias como parámetro para contabilizarlas utilizando el software GelPro Analyzer v4.0.

Por otro lado, utilizando las líneas celulares PC3 que tienen modulada la expresión de CtBP1 en forma estable, evaluamos su capacidad clonogénica *in vitro*. Para ello, sembramos 1000 células por placa de 100 mm y luego de 15 días de crecimiento en condiciones de cultivo celular, evaluamos la capacidad de estas células de formar

colonias aisladas. Los resultados mostraron que las células PC3.CtBP1 generaron un mayor número y tamaño de colonias respecto a las que fueron generadas por las células PC3.shCtBP1 (Figura 43).

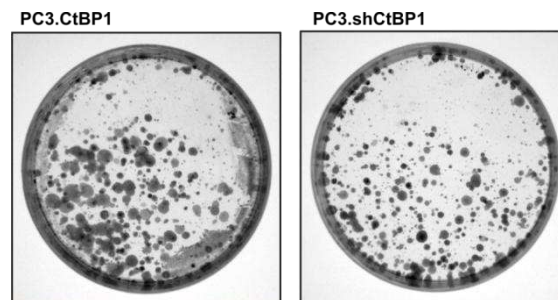


Figura 43. Crecimiento en colonias de células PC3 que tienen modulada la expresión de CtBP1 en forma estable. Ensayo clonogénico a partir de las líneas celulares estables PC3.CtBP1 y PC3.shCtBP1. Se plaquearon 1000 células por placa y se mantuvieron en condiciones de cultivo por 2 semanas permitiendo la formación de colonias aisladas. Se muestra un experimento representativo de dos réplicas independientes.

2.2.3. La sobre-expresión de CtBP1 aumenta la viabilidad de las líneas celulares de PCa, aún en baja concentración de suero fetal bovino.

Para determinar si CtBP1 aumenta la viabilidad de las células que lo sobre-expresan, analizamos mediante ensayos de MTS la viabilidad de las células PC3.CtBP1 y PC3.shCtBP1 en diferentes condiciones de cultivo. Para ello, incubamos las células en medio de cultivo suplementado con concentraciones variables de suero fetal bovino (SFB; 0; 2,5 y 10 %) y evaluamos la viabilidad de las mismas relativizando los resultados a la concentración más elevada de SFB.

Los resultados mostraron que las células que sobre-expresan CtBP1 presentan mayor viabilidad cuando las células fueron cultivadas en condiciones sub-óptimas de SFB (0 a 2,5 %) comparadas con las células que tienen disminuida la expresión de CtBP1 (Figura 44).

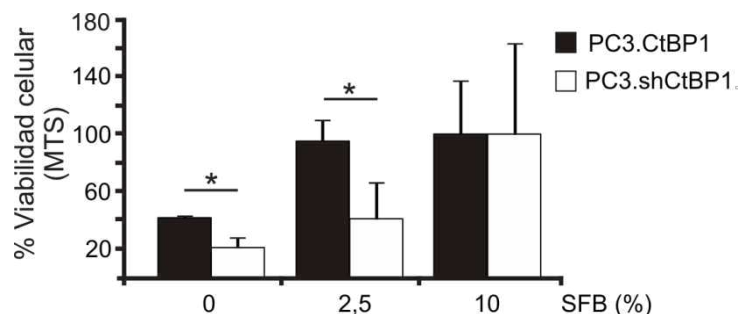


Figura 44. Viabilidad celular de las líneas celulares estables en presencia de distintas concentraciones de SFB. Se determinó la viabilidad celular por la técnica de MTS en las células PC3.CtBP1 y PC3.shCtBP1 en condiciones de cultivo suplementadas con distintos porcentajes de SFB durante 72 h. Se muestra un experimento representativo. * = $p < 0,05$.

En resumen, estos resultados muestran que CtBP1 aumenta la capacidad de transformar células en cultivo. Asimismo, las líneas celulares de PCa que sobre-expresan CtBP1 presentan una mayor viabilidad y capacidad clonogénica que aquellas que tienen silenciada la expresión de CtBP1.

2.2.4. La dieta suplementada con grasa es capaz de generar síndrome metabólico en ratones nude o C57BL6J.

Con el objetivo de investigar la influencia de la dieta sobre el rol de CtBP1 y BRCA1 en el desarrollo del PCa, utilizamos las líneas celulares estables anteriormente caracterizadas y establecimos un protocolo murino de alimentación con una dieta hipercalórica con alto contenido en grasas. Para ello, los ratones *nude* de 4 semanas de edad se alimentaron con una dieta control (20 Kcal/día) o con una dieta hipercalórica (50 Kcal/día) suplementada con grasa de origen animal, durante 10 semanas. Se determinó el peso corporal de los animales 3 veces por semana. Posteriormente, los ratones fueron subdivididos en dos grupos al azar y se les inoculó en forma s.c. las células PC3 o las células PC3 que tienen disminuida (PC3.shCtBP1) o aumentada (PC3.CtBP1) la expresión de CtBP1 previamente generadas. Se evaluó la aparición y el crecimiento tumoral durante aproximadamente 4-5 semanas como se describió previamente en la sección de materiales y métodos. Al cabo de este tiempo, los ratones fueron sacrificados y los tumores junto con hígado, riñones y sangre de los mismos fueron recolectados para su posterior análisis.

En paralelo con el modelo de ratones nude llevamos a cabo este mismo diseño experimental de alimentación con dieta control o hipercalórica pero utilizando ratones machos de 4 semanas de edad de la cepa C57BL6J y los alimentamos durante 16 semanas. Estos ratones fueron utilizados como control del modelo de sobrepeso ya que en la literatura los ratones C57BL6J están más ampliamente reconocidos como modelo para desarrollo de un fenotipo de obesidad. Al cabo de ese período los ratones fueron sacrificados y su sangre recolectada para realizar diferentes determinaciones bioquímicas.

Los resultados de esta serie de experimentos mostraron que los pesos de los animales alimentados con las diferentes dietas no variaron significativamente a lo largo del tiempo, tanto para los ratones de la cepa nude como los de la cepa C57BL6J. En la figura 45 A se muestra la curva de variación de peso para los animales de la cepa nude normalizado al peso inicial del tratamiento. En este caso se observa una leve diferencia entre ambas condiciones, sin embargo la misma no resultó ser estadísticamente significativa (Figura 45A).

Por medio de determinaciones bioquímicas evaluamos los niveles de los triglicéridos, la glucemia y el colesterol en los sueros de los ratones, con el fin de establecer una correlación entre la alimentación y los parámetros bioquímicos relacionados con alteraciones en el metabolismo. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos al evaluar los niveles de los triglicéridos (Figura 45C) y la glucemia (Figura 45D); sin embargo, los niveles de colesterol séricos en los animales alimentados con dieta hipercalórica aumentaron significativamente (Figura 45B).

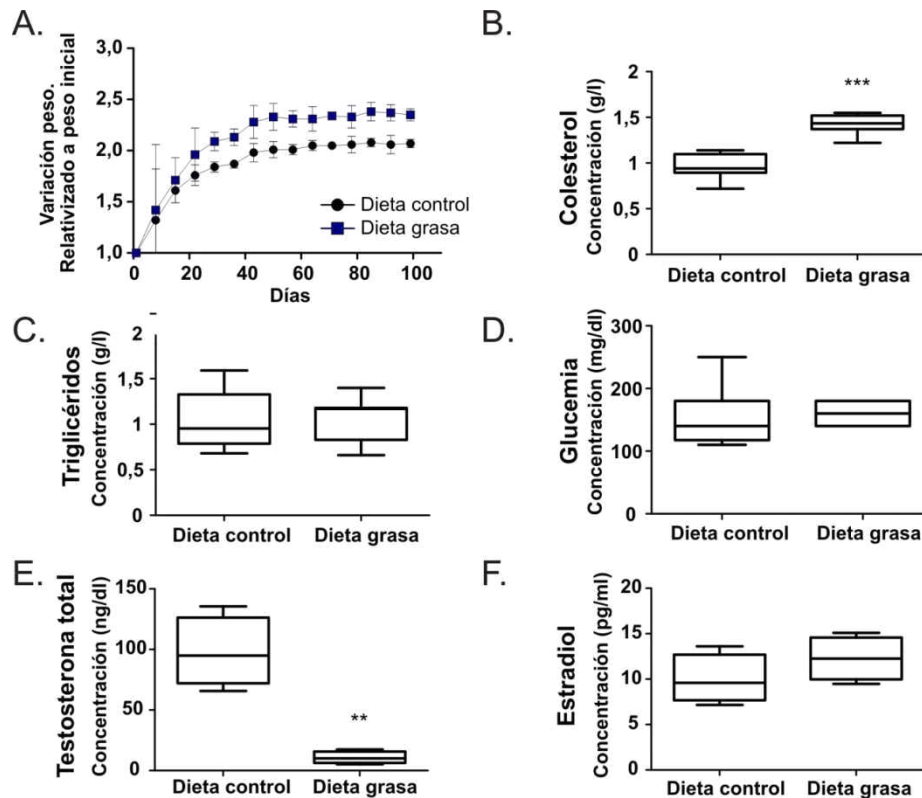


Figura 45. Efecto de la administración de la dieta hiper-calórica en un modelo murino. A) Curva de variación del peso de los animales relativizado al peso inicial al momento de comenzar el tratamiento ($p_{\text{diano}} / p_{\text{inicial}}$). Se muestran las medias de las variaciones de peso por tratamiento y sus desvíos ($n = 10$). B-C-D) Determinación de parámetros bioquímicos en los sueros de los animales alimentados con las diferentes dietas (Colesterol; Triglicéridos; Glucemia, respectivamente). Se muestran las medianas y sus desvíos en individuos de la cepa nude. E-F) Determinación de los niveles de hormonas sexuales circulantes en los sueros de los animales C57BL6J alimentados con la dieta control o hipercalórica (dieta grasa). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Finalmente evaluamos en los sueros de los ratones los niveles de las hormonas esteroides sexuales: testosterona y estradiol totales mediante la técnica de RIA con marcación de ^{125}I , como se describió en materiales y métodos. Además de las alteraciones en los parámetros bioquímicos anteriormente mencionados, el desbalance hormonal es una característica del desarrollo de un síndrome metabólico. Se postula que en el hombre, los niveles bajos de testosterona constituyen un

componente del síndrome metabólico (De Nunzio et al, 2012). Nuestros resultados muestran que los niveles de testosterona séricos disminuyeron drásticamente en los animales alimentados con una dieta con alto contenido de grasas (Figura 45E), sin observarse variaciones en cuanto a los niveles de estradiol entre los diferentes grupos (Figura 45F).

En colaboración con el Dr. Roberto Meiss (Jefe de Patología, Academia Nacional de Medicina) analizamos la histología de los hígados y riñones extraídos de los ratones y observamos que la dieta con alto contenido graso indujo marcadas alteraciones tisulares. El riñón mostró un patrón alterado de su arquitectura principalmente a nivel glomerular con agrandamiento de los mismos por hiper-celularidad mesangial; en los túbulos colectores se observó edema del epitelio. En el hígado se observó alteración de la arquitectura de los cordones hepáticos (destrabeculización) y fenómenos de degeneración grasa de los hepatocitos con pronunciada vacuolización citoplasmática de los mismos (Figura 46). Estas alteraciones histológicas, tanto en el hígado como en riñón, son consecuencia de las alteraciones en el metabolismo graso.

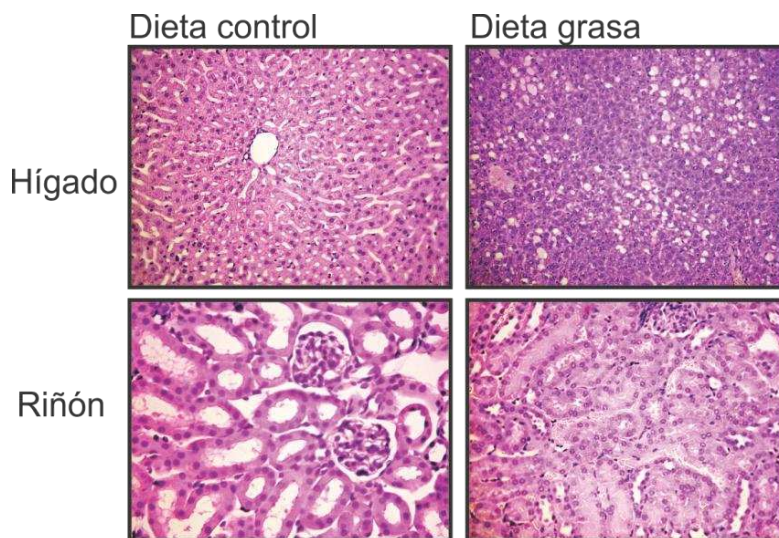


Figura 46. Efecto de la administración de la dieta hipercalórica en un modelo murino. Tinción con H&E en cortes histológicos de riñón e hígado de ratones nude alimentados con diferentes dietas. Fotografía de hígado, aumento original x250 y riñón x400.

En resumen, la dieta hipercalórica a pesar de no generar un aumento significativo en el peso de los animales, fue capaz de generar alteraciones metabólicas que se reflejaron como alteraciones histológicas a nivel hepático y renal, presencia de hígado graso, un incremento en los niveles de colesterol sérico y una disminución de la testosterona circulante. Estas evidencias demuestran que la administración durante 16 semanas de una dieta con alto contenido graso es capaz de generar un síndrome metabólico en los animales.

2.2.5. La dieta hipercalórica y el silenciamiento de la expresión de CtBP1 disminuyen el desarrollo tumoral prostático *in vivo*.

Al evaluar el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo en los animales inoculados con las células de PCa, no encontramos diferencias significativas en los volúmenes tumorales del grupo alimentado con la dieta control, inoculados ya sea con las células PC3 o las células PC3.CtBP1 o PC3.shCtBP1 (Figura 46A). Sin embargo, cuando los animales fueron alimentados con la dieta hipercalórica, encontramos que los volúmenes tumorales de aquellos animales inoculados con las células PC3.shCtBP1 eran significativamente menores que los otros dos tipos de tumores (Figura 46B). Cabe destacar además que del total de ratones inoculados con la línea celular PC3.shCtBP1 sólo el 67 % de los ratones desarrolló tumor en la condición de dieta grasa, mientras que el 100 % de los ratones inoculados en la condición dieta control desarrollaron tumor. Asimismo, el porcentaje de animales que desarrollaron tumor para la condición dieta grasa inoculados con las células PC3 fue del 100 % y del 86 % para los inoculados con las células PC3.CtBP1.

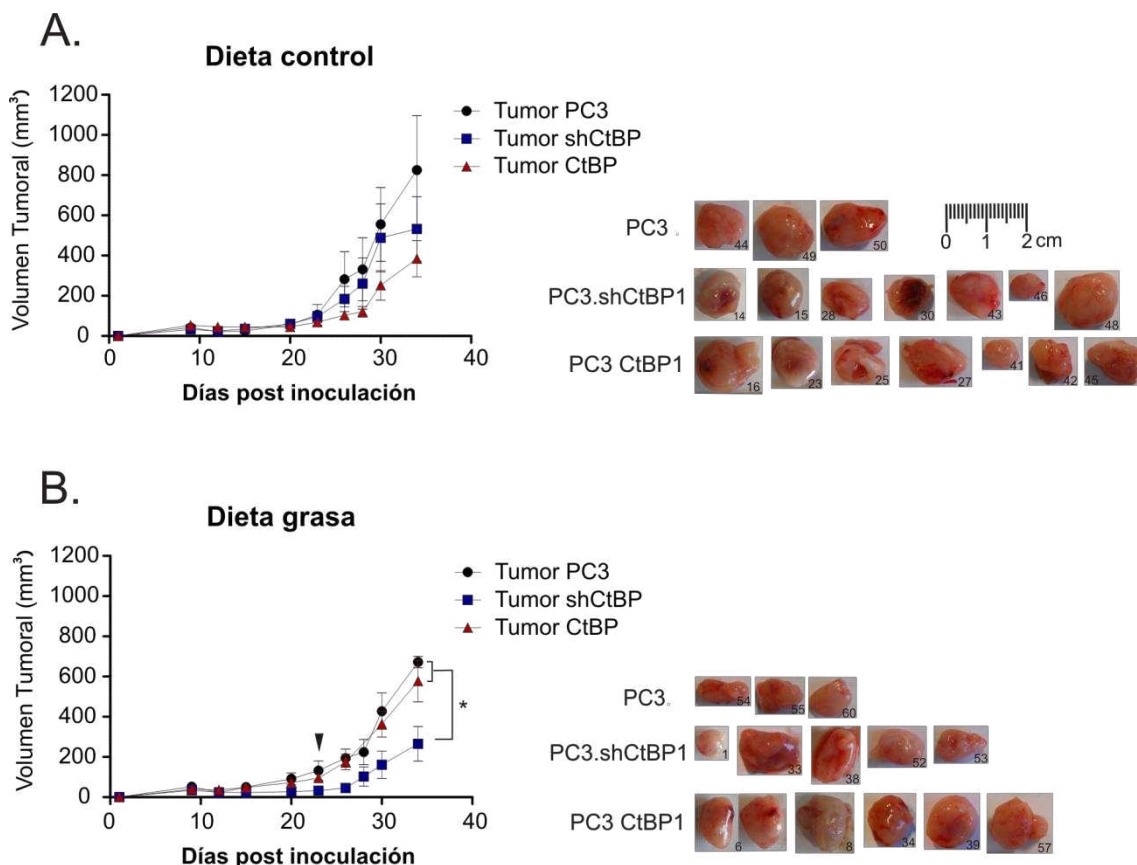


Figura 47. Efecto en el crecimiento tumoral en xenotransplantes que poseen modulada la expresión de CtBP1 generados en ratones nude alimentados con una dieta control o hipercalórica. Curva de crecimiento tumoral de células PC3, PC3.CtBP1 y PC3.shCtBP1 discriminadas por la dieta suministrada a los ratones nude. **A)** Dieta control; **B)** Dieta grasa. Se muestran fotografías de los tumores provenientes de los diferentes grupos. La flecha indica que a partir de este punto existen diferencias significativas entre el volumen tumoral de los tumores PC3 y PC3.CtBP1 respecto a los tumores PC3.shCtBP1. * $p < 0,05$.

Estos resultados demuestran que la dieta hipercalórica en conjunto con la disminución de la expresión de CtBP1 claramente reducen el desarrollo tumoral en este modelo de xenotransplantes.

2.2.6. Caracterización histológica de los tumores obtenidos por inoculación con las diferentes líneas celulares de PCa.

A partir de los tumores extirpados de los ratones, en colaboración con el Dr. Roberto Meiss, analizamos la histología de los mismos. En primer lugar se evaluó los niveles de expresión de CtBP1 por técnica inmunohistoquímica enzimática con un anticuerpo específico anti-CtBP1. De esta manera, hallamos que los tumores provenientes de ratones inoculados con células PC3.CtBP1 presentaban mayor expresión de CtBP1 que aquellos provenientes de ratones inoculados con las células PC3.shCtBP1 (Figura 48).

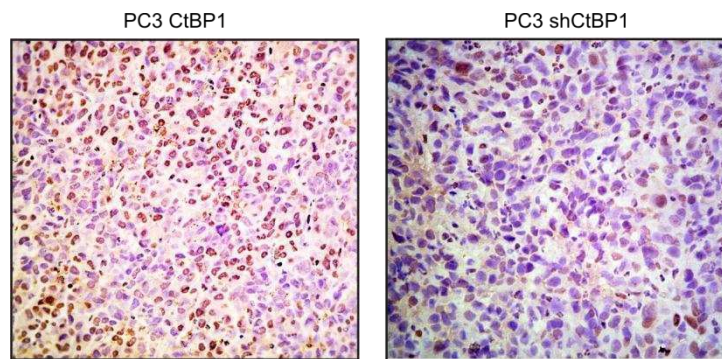


Figura 48. Expresión de CtBP1 *in vivo*. Tinción inmunohistoquímica para CtBP1 en cortes histológicos de los tumores generados como xenotransplantes a partir de la inoculación de las células estables pcDNA3 CtBP1 o shRNA CtBP1. Se muestran campos representativos (aumento original x250).

Para analizar la histología de estos tumores realizamos la tinción con H&E (Figura 49, panel izquierdo). Encontramos que los tumores originados a partir de la inoculación s.c. de células PC3 presentaban las características de un adenocarcinoma indiferenciado de aspecto homogéneo (Figura 49). Asimismo, los tumores originados por la inoculación de las células PC3.CtBP1 eran semi-diferenciados, compuestos por células uniformes, redondeadas y/o ovaladas, dispuestos en cordones sólidos hacia el centro del tumor. Las células tumorales presentan escaso citoplasma y núcleos prominentes, con escasas imágenes de mitosis (Figura 49). Por otro lado, los tumores originados a partir de las células PC3.shCtBP1, también son semi-diferenciados, pero en este caso se observaron células con marcada diferencia de formas y tamaños, además de poder apreciarse regular número de mitosis (Figura 49). En este caso las células tumorales mostraron un aspecto fusiforme con núcleos irregulares e hiper-

cromáticos alternando con células de formas más redondeadas, con citoplasma abundante. Se observan además, mitosis de tipo irregular. Interesantemente, en este grupo de tumores (PC3.shCtBP1) se observaron varios focos de necrobiosis y de leucocitos (Figura 49).

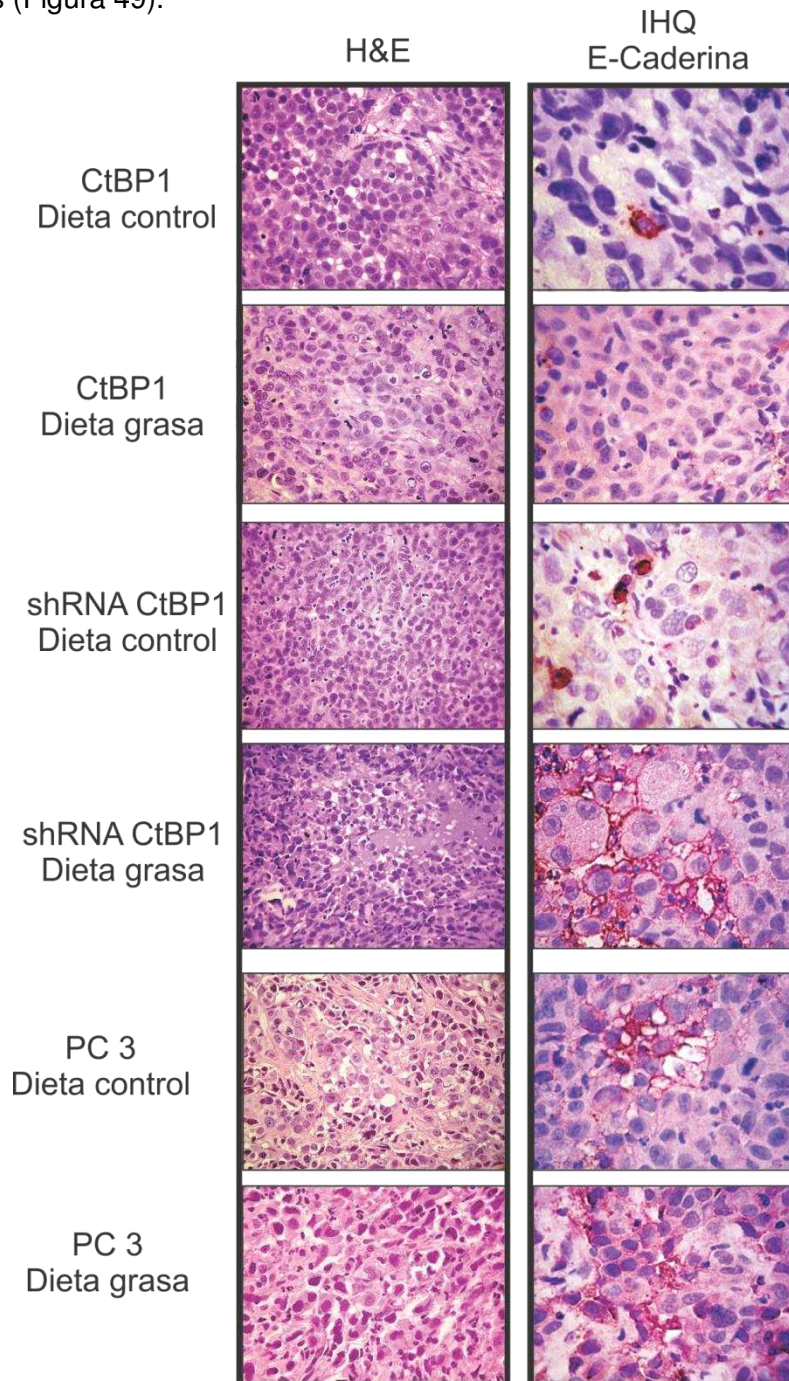


Figura 49. Características histológicas de los tumores generados como xenotransplantes. *Panel izquierdo:* Tinción con H&E mostrando el grado de diferenciación y las características estructurales en cortes histológicos de tumores de ratones generados por la inoculación de las células PC3, PC3.CtBP1 o PC3.shCtBP1 (400X). *Panel derecho:* Tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico para e-caderina (aumento original x250) en los mismos tumores.

Además, evaluamos la expresión inmunohistoquímica del marcador celular e-caderina en los cortes histológicos de estos tumores xenotransplantados. Determinamos que aquellos originados por las células PC3.CtBP1 provenientes de animales alimentados con dieta control, presentaban marcación leve de e-caderina en células aisladas, predominantemente en la periferia del tumor. Sin embargo, cuando los animales fueron alimentados con una dieta alta en grasa e inoculados con estas mismas células (PC3. CtBP1) observamos una marcación moderada y heterogénea de e-caderina (Figura 49, panel derecho). Por otro lado, en los tumores originados a partir de células que tienen disminuida la expresión de CtBP1, observamos una marcación moderada de e-caderina también en células aisladas y hacia la periferia, con una marcación más intensa en el grupo alimentado con la dieta grasa (Figura 49). Es importante aclarar que en el grupo PC3.shCtBP1 dieta grasa, la marcación de e-caderina se observa una marcación predominantemente de la membrana celular de las células ubicadas en los focos de necrobiosis (Figura 49). Finalmente, en los tumores originados por inoculación de células PC3, la marcación de e-caderina fue leve a moderada, difusa, en regiones de células aisladas no adheridas de los focos de necrobiosis.

2.2.7. La dieta hipercalórica genera un incremento en los niveles de NADH y variaciones de las hormonas intratumoral.

Con el fin de evaluar y reconocer el efecto de la dieta y la expresión de CtBP1 en los tumores generados en los xenotransplantes en cuanto a la expresión de BRCA1 y al crecimiento tumoral, decidimos evaluar los niveles hormonales de estradiol y testosterona intratumoral, así como también el estado metabólico del tumor al evaluar la relación de NAD⁺/NADH presentes en el mismo.

Mediante un RIA con marcación de ¹²⁵I determinamos los niveles de estradiol y testosterona intratumoral para cada una de las dietas agrupando los tumores generados por las diferentes líneas celulares. De esta manera determinamos que los tumores que se desarrollaron en los animales alimentados con dieta control no presentaban diferencias significativas en cuanto a los niveles de testosterona total respecto a los generados en los animales alimentados con la dieta hipercalórica. Sin embargo, los niveles de estradiol intratumoral de los tumores desarrollados en el grupo de dieta grasa mostraron un aumento significativo con respecto al grupo alimentado con dieta control (Figura 50A y B).

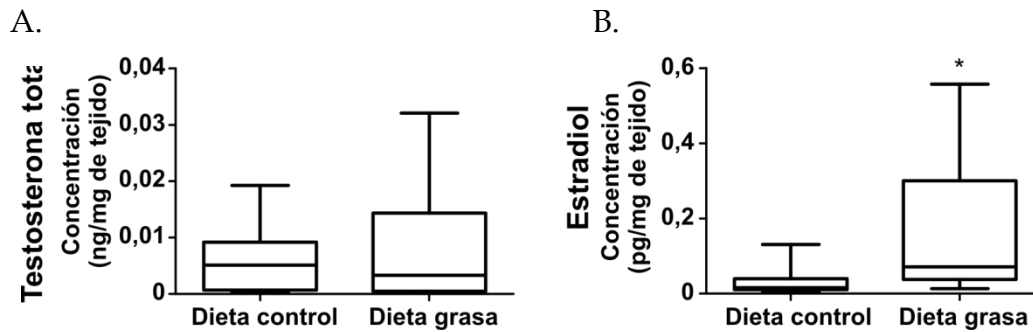


Figura 50. Determinación de niveles hormonales intratumoral. Mediante RIA se determinaron los niveles de A) Testosterona y B) Estradiol, en los tumores extraídos de los xenotransplantes. Los resultados muestran la mediana y desvíos de la concentración de hormona de 9 tumores generados por las 3 líneas celulares en los animales alimentados con la dieta control o dieta grasa. * $p < 0,05$

Como hemos mencionado en reiteradas ocasiones anteriormente, CtBP1 se activa por la unión a NADH, el cual aumentaría en condiciones de obesidad o una alta ingesta calórica. En virtud de esto, decidimos evaluar los niveles de NADH y la relación $NAD^+/NADH$ en los tumores generados por las diferentes líneas celulares en los tratamientos por las diferentes dietas administradas. Los resultados obtenidos mostraron que existe una disminución significativa en la relación $NAD^+/NADH$ en aquellos tumores provenientes de animales alimentados con una dieta hipercalórica respecto a sus controles (Figura 51). De esta manera podemos concluir que bajo estas condiciones CtBP1 podría encontrarse activado en el tumor.

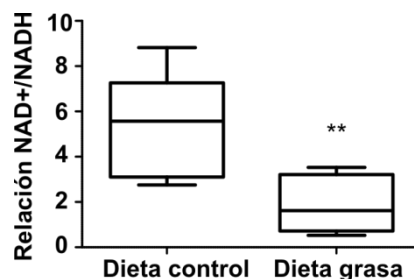


Figura 51. Estado energético tumoral por determinación de la relación $NAD^+/NADH$. Se determinó la relación de $NAD^+/NADH$ en tumores provenientes de animales alimentados con dieta control ($n = 4$) o dieta grasa ($n = 4$), generados por la inoculación de las líneas celulares de PCa como se describió en materiales y métodos. Se muestra la mediana y desvío. ** $p < 0,01$.

2.2.8. La modulación de la expresión de CtBP1 en los xenotransplantes regula la transcripción de BRCA1 *in vivo*.

A partir del ARN aislado de los tumores, realizamos ensayos de RT-qPCR para determinar los niveles de expresión de CtBP1 y de BRCA1 *in vivo*. Como se muestra en la figura 52, los tumores generados a partir de las células PC3.CtBP1 presentaron mayores niveles de ARNm de CtBP1 respecto a aquellos que fueron generados con

las células PC3.shCtBP1, sin observarse diferencias en dichos niveles al comparar el efecto de las diferentes dietas (Figura 52A). Para el caso de los tumores generados con las células PC3, no se observaron diferencias en cuanto a la expresión de CtBP1 por efecto de las dietas administradas. Por otro lado, la sobre-expresión de CtBP1 reprimió significativamente la expresión de BRCA1, independientemente de si estos tumores fueron generados en ratones alimentados con dieta control o hipercalórica. Sin embargo, encontramos que la expresión de BRCA1 se encontraba fuertemente reprimida en aquellos tumores generados por las células PC3.shCtBP1 en animales alimentados con dieta grasa (Figura 52B). No obstante, los tumores generados con las células PC3, no mostraron diferencias en cuanto a la expresión de BRCA1.

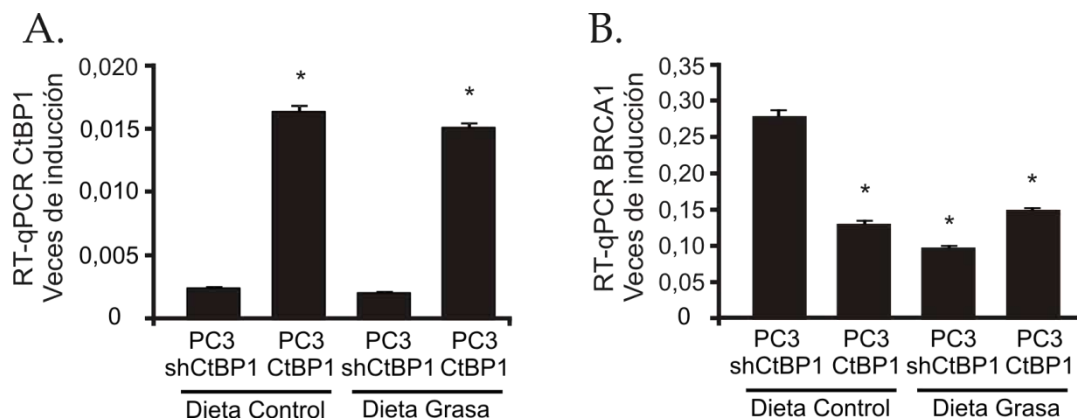


Figura 52. Expresión de CtBP1 y BRCA1 *in vivo*. RT-qPCR de ARNm de los tumores generados a partir de la inoculación de las células PC3.CtBP1 y PC3.shCtBP1 en los ratones nude alimentados con las dietas control o hipercalórica (grasa). Las barras representan la media y el desvío estándar de los valores obtenidos a partir de 3 ratones. Se utilizaron *primers* específicos para: **A)** CtBP1; **B)** BRCA1. Los datos se relativizaron a Actina. * = p , 0,05.

En virtud de estos resultados podemos concluir que la dieta grasa disminuye fuertemente la relación NAD⁺/NADH favoreciendo la actividad de CtBP1 y en consecuencia participando en la represión de BRCA1 en los tumores xenotransplantados. Además, los niveles hormonales intratumorales se ven afectados por la dieta administrada y este efecto influenciaría la regulación transcripcional de BRCA1.

2.2.9. La dieta hipercalórica y la sobre-expresión de CtBP1 aumentan la viabilidad celular *in vitro*.

Para validar los resultados obtenidos *in vivo* y profundizar en el mecanismo de regulación de la vía de CtBP1/BRCA1, utilizamos un modelo *in vitro* recientemente desarrollado por Price y col. (Price et al, 2012) mediante el cual evaluamos el efecto

del suero obtenido de los ratones alimentados con una dieta hipercalórica o control sobre la proliferación de las líneas celulares estables que tienen modulada la expresión de CtBP1.

Para ello, incubamos las células PC3.CtBP1 o PC3.shCtBP1 con medio de cultivo suplementado con una concentración de 2,5 % de suero de animales alimentados con una dieta control (Suero D.control) o con una dieta hipercalórica (Suero D.grasa) durante 72 h y determinamos la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS. Los resultados mostraron que el suero proveniente de ratones alimentados con dieta hipercalórica aumenta la viabilidad de las células PC3 que sobre-expresan CtBP1 sin alterar la viabilidad de las células que tienen silenciado CtBP1 (Figura 53). Asimismo no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de las células PC3 por la incubación de las células con los diferentes sueros.

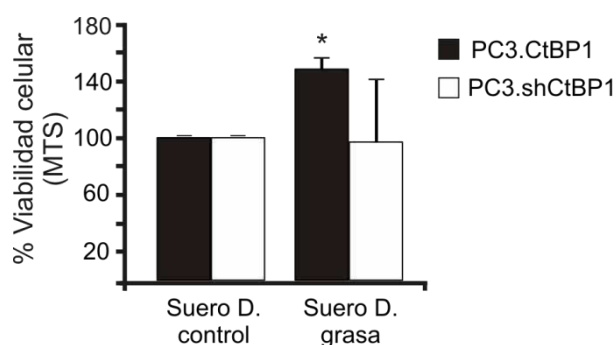


Figura 53. Viabilidad de las líneas celulares de PCa incubadas con suero obtenido de ratones alimentados con las distintas dietas. Se determinó la viabilidad celular por la técnica de MTS en las células PC3.CtBP1 y PC3.shCtBP1 crecidas en medio de cultivo suplementado con 2,5 % de suero obtenido de ratones *nude* alimentados con una dieta control o con una dieta hipercalórica durante 72 h. Las barras representan la media y el desvío estándar de 2 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

2.2.10. La viabilidad de las células de PCa que sobre-expresan CtBP1 disminuye en presencia de testosterona y sueros de animales alimentados con dieta hipercalórica.

Como mencionamos anteriormente, los sueros provenientes de los animales alimentados con una dieta hipercalórica presentan niveles inferiores de testosterona. Por consiguiente nos preguntamos si esta diferencia podría tener algún efecto sobre la proliferación de las células que constituyen el tumor. Considerando nuestros resultados previos donde la testosterona promovía la inducción de BRCA1 en células PC3, y el aumento de la viabilidad de las células PC3.CtBP1 cuando eran incubadas con suero proveniente de animales alimentados con dieta grasa, decidimos evaluar el efecto de la testosterona en la viabilidad de las células de PCa que tienen modulada la expresión de CtBP1.

De esta manera, incubamos las células PC3.CtBP1 o las células PC3.shCtBP1 en medio de cultivo suplementado con los sueros dieta control o dieta grasa y el agregado o no de testosterona. Los resultados mostraron que el aumento de la viabilidad en las células PC3.CtBP1 observado anteriormente, se revertía cuando se administraba conjuntamente con la testosterona. Sin embargo, en las células que tienen silenciada la expresión de CtBP1, el agregado de testosterona no produjo ningún efecto.

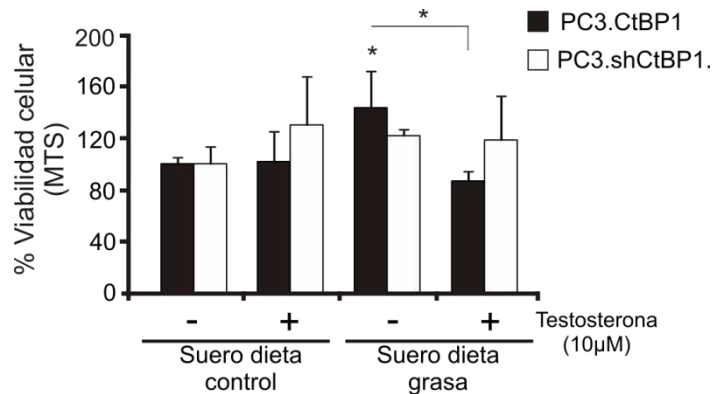


Figura 54. Viabilidad celular de líneas de PCa incubadas con sueros obtenidos de ratones alimentados con las distintas dietas y suplementado con testosterona. Se determinó la viabilidad celular por la técnica de MTS en las células PC3.CtBP1 y PC3.shCtBP1 crecidas en medio de cultivo suplementado con 2,5 % de suero obtenido de ratones *nude* alimentados con una dieta control o con una dieta hipercalórica durante 72 h, y con el agregado de testosterona 10µM. Las barras representan la media y el desvío estándar de 3 réplicas. * $p < 0,05$.

En conclusión, estos resultados muestran que los sueros obtenidos de animales alimentados con dieta hipercalórica aumentan la viabilidad de las células que sobre-expresan CtBP1. Además la administración de una dieta alta en grasa produce una marcada disminución de los niveles de testosterona, lo cual es un factor adicional que favorece este aumento en la viabilidad de las células insensibles a andrógenos, ya que la presencia de esta hormona en cultivo es capaz de revertir los efectos de la dieta sobre la viabilidad celular.

2.3. Conclusiones.

En este capítulo hemos abordado el estudio de la regulación transcripcional de BRCA1 por diferentes factores. Hemos sido capaces de determinar que de acuerdo al tipo celular el promotor de BRCA1 responde diferencialmente a la estimulación con testosterona, activando o reprimiendo su transcripción. Posiblemente esta respuesta dual a la testosterona se deba a la aromatización de la misma a estradiol siendo este último el responsable de la respuesta en las células PC3. Del mismo modo, hemos demostrado el papel de CtBP1 en la regulación transcripcional de BRCA1 en las células de PCa. Debido a la función de CtBP1 como sensor del estado metabólico

celular, nos preguntamos si variaciones en la relación $NAD^+/NADH$ conducirían a una regulación de la transcripción de BRCA1 y qué efecto produciría esto *in vivo*. En este contexto, generamos un modelo animal con características tanto histo-patológicas como bioquímicas de un síndrome metabólico por alimentación de ratones de las cepas nude y C57BL6J con dieta hipercalórica. Utilizando este modelo inoculamos las células de PCa con expresión modulada de CtBP1 y evaluamos el desarrollo tumoral. Interesantemente encontramos que la disminución de la expresión de CtBP1 en conjunto con una dieta de alto contenido graso, disminuyó el volumen tumoral. Finalmente pudimos determinar que los sueros de animales alimentados con dieta grasa, incrementaban la viabilidad celular específicamente de las células de PCa que sobre-expresan CtBP1.

Los resultados aquí presentados muestran un nuevo tipo de regulación transcripcional de BRCA1 y proponen al eje CtBP1/BRCA1 como una nueva vía molecular que podría tener relevancia en el desarrollo tumoral prostático en un contexto de síndrome metabólico.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis estudiamos dos aspectos diferentes del supresor tumoral BRCA1 en el PCa:

- i)* El rol de BRCA1 como co-regulador de la transcripción en procesos de daño en el ADN, a través de la regulación de la transcripción de ATM, una de las proteínas clave en el mantenimiento de la integridad genómica.
- ii)* El efecto de los andrógenos, estrógenos y/o una dieta alta en grasa sobre la regulación transcripcional de BRCA1 y el desarrollo tumoral prostático.

A continuación presentaremos los aspectos más relevantes de nuestros hallazgos en el contexto del conocimiento sobre este tema, discutiendo los puntos más sobresalientes de nuestros resultados.

CAPITULO I

1. Rol de BRCA1 en la regulación de la transcripción en respuesta al daño en el ADN.

La respuesta celular frente al daño en el ADN es un proceso complejo que involucra diversas vías de transducción de señales en las cuales participa activamente ATM (Lieberman, 2008; Zhou & Elledge, 2000). Esta quinasa es activada en presencia de daño doble cadena y transmite la señal de activación por fosforilación a diferentes proteínas blanco. Como resultado de ello, una amplia variedad de respuestas celulares son desencadenadas, entre las que podemos mencionar el arresto del ciclo celular por activación de los puntos de control durante el proceso de división celular, el inicio de programas de transcripción, la ejecución de la reparación del ADN y, en algunas ocasiones, la inducción de la muerte celular en caso de que el daño persista o no pueda ser reparado. Es por ello que nos preguntamos si sólo la actividad quinasa de ATM es importante en los mecanismos de la regulación de la respuesta al daño en el ADN; o si la regulación a nivel transcripcional de este gen es un proceso relevante en la respuesta al estrés genotóxico. En base a esto, el objetivo principal fue identificar los factores que intervienen en la activación transcripcional de ATM.

En la actualidad existen pocas evidencias que demuestren la regulación transcripcional de ATM en condiciones normales, o en situaciones de estrés celular. De hecho, como mencionamos anteriormente en la introducción, los niveles proteicos de ATM, así como también su expresión, no varían significativamente durante el ciclo celular ni tampoco se ven afectados cuando las células son expuestas a radiación ionizante (Watters et al, 1997), lo que hace suponer en principio que sólo mecanismos post-traduccionales, como su auto-fosforilación en la S1981, son los que gobiernan su activación. Sin embargo, previamente Berkovich y Ginsberg (Berkovich & Ginsberg, 2003) encontraron que E2F1 aumenta la actividad del promotor de ATM induciendo los niveles de ARNm y de proteína en respuesta al daño en el ADN. Esto es acompañado por un aumento de la fosforilación de p53 inducido por E2F1.

Nuestros resultados indican que existe un complejo sistema regulatorio de la transcripción de ATM conformado por las proteínas BRCA1, E2F1 y CtIP que modulan la expresión de ATM. Algunas evidencias demuestran un rol activo de BRCA1 como regulador de la transcripción. Así, por ejemplo, la proteína BRCA1 contiene en su secuencia dos dominios de activación transcripcional (TAD) (Chapman & Verma, 1996) (Ye et al, 2001). Además es capaz de interactuar con múltiples componentes de la maquinaria basal de la transcripción y con numerosos factores de transcripción y co-reguladores transcripcionales (Somasundaram, 2003).

En este trabajo demostramos que BRCA1 es capaz de modular la transcripción de ATM. En la secuencia promotora de ATM, identificamos sitios putativos de unión para E2F1 que actuarían como plataforma para el reclutamiento de los distintos componentes del complejo regulatorio de la transcripción de ATM. El factor de transcripción E2F1 actuaría como una molécula de andamiaje que recluta a las proteínas BRCA1 y CtIP. De esta manera, la asociación al promotor de ATM de este complejo activa su transcripción. Sin embargo, en presencia de daño en el ADN, a través de la administración de agentes genotóxicos como la doxorubicina, BRCA1 y CtIP son liberados quedando E2F1 asociado a la secuencia promotora de ATM, y en este contexto se reprime su expresión.

Aunque nuestros resultados parecen ser opuestos a los obtenidos por Berkovich y Ginsberg, cabe destacar que existen diferencias sustanciales entre ambos modelos. Nuestros resultados fueron obtenidos en células tumorales deficientes para p53 (p53^{-/-}), mientras que los resultados obtenidos por Berkovich y Ginsberg fueron encontrados en células no tumorales con p53 salvaje.

Fortaleciendo aún más nuestros resultados, podemos mencionar que existe en la bibliografía numerosos trabajos que describen mecanismos similares de regulación de la transcripción como el que nosotros hemos encontrado. Un ejemplo de ello ocurre con el gen ZKRB1, regulado por el complejo BRCA1-Rb-E2F1-CtIP (Liao et al, 2010). Otro ejemplo que podemos mencionar es el mecanismo de auto-regulación transcripcional novedoso que nuestro grupo identificó para BRCA1 en respuesta al daño genotóxico (De Siervi et al, 2010). Este trabajo muestra que BRCA1 forma un complejo con las proteínas E2F1 y RB, el cual actúa reprimiendo la transcripción de BRCA1. Sin embargo en situación de estrés genotóxico, este complejo se ve irrumpido, resultando en el desplazamiento de BRCA1 de su propio promotor y en este contexto se activa su transcripción. Además, nuestro grupo identificó por primera vez que BRCA1 se asociaba diferencialmente a los promotores de diversos genes en condiciones de exposición a UV (De Siervi et al, 2010). En estos estudios se determinó que más del 90% de los genes a los que BRCA1 se asocia están involucrados en la respuesta al daño en el ADN y en la regulación del ciclo celular, lo cual hasta el momento había sido sugerido por varios autores pero no había sido demostrado. En este contexto, la regulación de ATM por BRCA1, uno de los targets encontrados en ese análisis (De Siervi et al, 2010), brinda un elemento más en el entendimiento y la identificación de las características funcionales de BRCA1.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la respuesta frente al daño en el ADN es crítica para poder determinar el destino de una célula, pudiendo ésta reparar el

daño para continuar con su programa celular, o bien no pudiendo superar el estrés genotóxico para continuar hacia la muerte celular programada. En caso de que ninguno de estos mecanismos sea exitoso, la célula dañada podrá persistir y acumular mutaciones que pueden llevarla a transformarse en una célula tumoral (Lieberman, 2008). En la actualidad los agentes quimioterapéuticos que generan daño en el ADN y se utilizan para el tratamiento del cáncer, actúan principalmente inhibiendo la actividad de la enzima topoisomerasa I y II, e introduciendo rupturas temporales en la cadena de ADN. Ejemplos de estos son el etopósido, mitoxantrona, irinotecan y topotecan, usualmente utilizados en el tratamiento de cáncer de mama y ovario. Otro grupo de drogas que generan inhibición de la actividad de las topoisomerasas son las que pertenecen al grupo de las antraciclinas como la doxorubicina y la epirubicina. Estos agentes estabilizan los complejos ADN-topoisomerasa y provocan la ruptura doble cadena de la hebra de ADN por el arresto de las horquillas de replicación (Minotti et al, 2004). Sin embargo, estas últimas tienen mecanismos adicionales de acción, como generar puentes intra-catenarios en el ADN y radicales libres derivados del oxígeno (Minotti et al, 2004).

En este trabajo evaluamos los efectos de diversos agentes quimioterapéuticos, como la doxorubicina, la mitoxantrona y el etopósido, sobre la regulación de la expresión de ATM en células de PCa. Los resultados indicaron que pese a tener mecanismos similares de acción, estas drogas fueron capaces de desencadenar respuestas diferentes en la regulación transcripcional de ATM, siendo los tratamientos con doxorubicina o mitoxantrona los que reprimieron significativamente su expresión.

Cabe destacar además que las mutaciones en el gen de ATM correlacionan con un riesgo elevado para desarrollar PCa (Angele et al, 2004) y también ha sido demostrado que las mutaciones en BRCA1 se asocian con fenotipos más agresivos en este tipo de cáncer (Douglas et al, 2007; Gallagher et al, 2010). Por otro lado, la pérdida de expresión de ATM en tejidos donde es nula la expresión de p53, aumenta la sensibilidad de las células a agentes que generan daño en el ADN (Westphal et al, 1998). Además ha sido demostrado que la expresión atenuada de ATM incrementa la radiosensibilidad en tumores humanos (Fan et al, 2000).

En resumen, consideramos que este trabajo de tesis incrementó el conocimiento del rol de ATM y BRCA1 en la respuesta al daño en el ADN en el PCa. Estos hallazgos son importantes ya que las mutaciones en estos genes, o las variaciones en la expresión de los mismos podrían afectar la respuesta a agentes quimioterapéuticos que causan daño en el ADN y por lo tanto deberían ser consideradas en el momento de la elección de una terapia adecuada para pacientes con PCa.

CAPITULO II

2.1. Regulación transcripcional de BRCA1 por estímulos hormonales.

La proteína BRCA1 presenta funciones muy importantes en el mantenimiento de la homeostasis celular. La deficiencia de BRCA1 aumenta la proliferación celular, el número de mitosis aberrantes y la inestabilidad genómica interviniendo en procesos que conducen a la tumorigénesis (Deng, 2006).

Como hemos mencionado, diferentes estímulos son capaces de regular la transcripción de este gen. Así fue descrito que tanto los agentes genotóxicos, la hipoxia o la estimulación con diversos agentes mitogénicos, como las hormonas esteroideas, son capaces de intervenir en la regulación de su transcripción (Andres et al, 1998; Bindra et al, 2005; Gudas et al, 1995). En las células de cáncer de mama, está ampliamente estudiado el rol de los estrógenos en la regulación positiva de la expresión de BRCA1. La testosterona tiene un rol fundamental en el desarrollo normal de la próstata y también en el desarrollo patológico de la glándula que conduce a carcinoma. En este trabajo nos focalizamos en estudiar el rol de los andrógenos en la regulación de la transcripción de BRCA1 en PCa.

Uno de los principales enigmas de la actualidad en la investigación del PCa es comprender de qué manera esta enfermedad progresa desde un estadio sensible a hormonas hacia uno insensible y con características mucho más agresivas. En este trabajo de tesis utilizamos dos líneas celulares de PCa que representan estadios diferentes de la enfermedad. Las células LNCaP son sensibles a hormonas y expresan AR; mientras que las células PC3 son insensibles a la estimulación con andrógenos y carecen de expresión de AR. Para investigar si BRCA1 participa en los mecanismos que llevarían a la célula tumoral a perder la sensibilidad a las hormonas adoptando características más agresivas, utilizamos ambas líneas celulares y evaluamos el efecto de los andrógenos sobre la regulación transcripcional de BRCA1. Nuestros resultados mostraron que la estimulación con testosterona llevaba a respuestas diferentes en la regulación de la expresión de BRCA1, dependiendo si la línea celular es sensible o no a la estimulación con andrógenos. Así, en las células LNCaP que expresan el AR, la testosterona reprime la expresión de BRCA1. Por otro lado, los andrógenos inducían la expresión de BRCA1 en las células PC3, que no presentan AR; sin embargo la restitución de la expresión de AR no modificó la respuesta demostrando que es independiente de la expresión de AR. Un hallazgo llamativo en nuestros resultados fue que al tratar las células tumorales con un inhibidor de la enzima aromatasa, de manera de bloquear la aromatización de testosterona a estradiol, encontramos que las células

PC3 perdían el efecto de inducción observado sobre el promotor de BRCA1 debido a la estimulación con la testosterona. Esto indicaría que esta regulación podría estar mediada por el estradiol en las células PC3. Sin embargo, este efecto no se observaba al tratar a las células LNCaP con este inhibidor, es decir; aún bajo estas condiciones, la expresión de BRCA1 continuaba reprimida.

Estas diferencias observadas podrían atribuirse a variaciones en las vías de señalización y síntesis que involucran a estas hormonas en los distintos tipos celulares. Por ejemplo ha sido reportado que las células PC3 expresan niveles mayores de la enzima aromatasas que las células LNCaP (Ellem et al, 2004). En este sentido, la estimulación con testosterona, estaría favoreciendo en las células PC3 un incremento en la síntesis de estradiol. Por otro lado también existen diferencias en cuanto a la expresión de receptores de estrógenos en estas células. La línea celular LNCaP, presenta elevada expresión del ER- α mientras que expresan en menores niveles el receptor ER- β . Por otro lado, las células PC3 muestran un patrón opuesto de expresión del ER, siendo el ER- β el que expresan en mayores niveles y el ER- α el de menor expresión (Carruba, 2006). Cabe destacar que pese a que los andrógenos son las hormonas principales en estimular e inducir el desarrollo de la glándula prostática, tanto las células basales como luminales de la próstata expresan también los receptores de estrógenos (ER- α y - β), y las hormonas estrogénicas cumplen también funciones muy importantes en el desarrollo y maduración de las células prostáticas.

En virtud de estos resultados, hemos sido capaces de identificar un comportamiento diferencial en la regulación de la transcripción de BRCA1 por testosterona en las células de PCa. Aún queda mucho trabajo por realizar, no obstante, los resultados presentados en este trabajo señalan una diferencia en cuanto a la expresión de BRCA1 modulada diferencialmente en estos dos estadios de la progresión del PCa, lo cual podría afectar la agresividad y la proliferación tumoral. En el futuro estos hallazgos podrían ser importantes para el desarrollo de una terapia efectiva para el estadio avanzado de la enfermedad.

2.2. La dieta como factor de riesgo en el cáncer de próstata a través de la modulación transcripcional de BRCA1.

A pesar de la alta incidencia y mortalidad que se observa para el PCa, los únicos factores de riesgo ampliamente reconocidos son la edad, la raza y la historia familiar. Sin embargo, como describimos anteriormente, el ambiente y el estilo de vida, son factores que se presentan relacionados con el riesgo de desarrollar esta patología. Se observó que la adopción de un estilo de vida occidental, sedentarismo y dietas con alto contenido calórico (grasas, azúcares y carnes), contribuyen en el aumento del riesgo de desarrollar PCa (McGrowder et al, 2012).

En las últimas dos décadas, la prevalencia de síndromes metabólicos se ha ido incrementando a nivel mundial, tanto que es considerada un serio problema de salud pública en muchos países. La obesidad, uno de los indicadores del síndrome metabólico, es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II; y en los últimos años ha sido asociada con el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer. Diversos datos epidemiológicos sugieren una asociación significativa entre el aumento del BMI y algunos tipos de cáncer como los hematológicos, de páncreas, próstata y mama entre otros (Khandekar et al, 2011). A pesar de esto, no existen evidencias definitivas que determinen el mecanismo responsable del aumento del riesgo de cáncer en personas con síndrome metabólico.

El tejido adiposo tiene un rol activo en la señalización endócrina en el organismo. Este es capaz de secretar al flujo sanguíneo diversas moléculas que señalizan en distintos órganos de acuerdo a las demandas metabólicas de cada uno. Así pues ha sido determinado que en mama, el tejido adiposo es una fuente de hormonas estrogénicas extragonadales que actúan de manera parácrina en las células de este órgano.

Por otro lado, en los hombres la obesidad ha sido asociada con una disminución en los niveles totales de testosterona, y existe una relación inversa entre los niveles de testosterona total y el BMI (De Nunzio et al, 2012).

La obesidad y una alta ingesta calórica diaria lleva a variaciones en los niveles intracelulares del pool de NAD⁺/NADH. El NADH permite la dimerización y activación del interruptor metabólico CtBP1, que es un co-represor de dos supresores tumorales: BRCA1 y E-caderina (Chinnadurai, 2009; Di et al, 2010). Sin embargo, este mecanismo nunca fue estudiado en el PCa.

En este aspecto hemos realizado numerosos aportes respecto a la regulación transcripcional de BRCA1 por CtBP1. Mediante estudios *in vitro*, nuestros resultados indicaron que CtBP1, tal como fue descrito en mama (Di et al, 2010), es capaz de

regular la expresión de BRCA1. Esta proteína se une al promotor de BRCA1 y reprime su transcripción. Además, pudimos determinar que la sobre-expresión de CtBP1 en las células de PCa, incrementan la proliferación celular y el desarrollo de colonias transformadas. Estos hallazgos muestran un posible rol oncogénico de la proteína CtBP1 en el PCa. Nuestro próximo objetivo será estudiar en profundidad el mecanismo de transformación que potencia CtBP1. Así, además de la proliferación, investigaremos el efecto de CtBP1 sobre la resistencia a la apoptosis, el crecimiento libre de anclaje, entre otros procesos, y la participación de BRCA1 en cada uno de ellos. Otro aspecto importante a evaluar en el futuro es la influencia de estas proteínas sobre la formación de cultivos tridimensionales también conocido como prostatosferas.

Hasta este trabajo de tesis, no habían sido desarrollado modelos *in vivo* para investigar la co-represión de E-caderina y/o BRCA1 por CtBP1. Considerando todas estas evidencias, nos propusimos evaluar en un modelo murino de obesidad inducido por la dieta, los efectos de una alta ingesta calórica y la modulación genética del co-represor transcripcional CtBP1 en el desarrollo y crecimiento de tumores inoculados en ratones nude. A pesar de no haber podido generar un modelo de sobrepeso, la dieta suplementada en grasa indujo un estado similar al síndrome metabólico debido a que los ratones mostraban altos niveles de colesterol, bajos niveles de testosterona y desorganización tisular del hígado (hígado graso) y los riñones. Más aún, los tumores desarrollados en los ratones con un estado similar al síndrome metabólico mostraban una baja relación NAD⁺/NADH lo cual apoya fuertemente nuestra teoría del aumento de NADH en condiciones de dietas hipercalóricas.

Si bien nuestra hipótesis apuntaba a que la dieta hipercalórica podría resultar ser un promotor del desarrollo tumoral en las células que sobre-expresan CtBP1 por su rol de represor de BRCA1 en presencia de alta energía, gracias a su interacción con la molécula de NADH; nuestros resultados mostraron que el volumen tumoral en los ratones inoculados con las líneas celulares PC3 y PC3.CtBP1 fue similar para ambas dietas suministradas. Sin embargo, sorprendentemente, los tumores que se generaron por inoculación con las células PC3.shCtBP1 eran de menor tamaño solo en los animales que se alimentaron con la dieta hipercalórica, incluso el porcentaje de aparición de tumores en este grupo fue drásticamente menor.

A partir de estos resultados, se desprendería una primera conclusión, el desarrollo tumoral en un contexto de alta energía es dependiente de la expresión de CtBP1. Sin embargo, la sobreexpresión de CtBP1 en animales alimentados con dieta grasa no aumentó el desarrollo tumoral probablemente debido a que la sobreexpresión de CtBP1 no fue lo suficientemente alta para observar diferencias *in vivo*. A pesar de que

los resultados *in vitro* muestran algunas propiedades oncogénicas de la proteína CtBP1, es posible que *in vivo* se generen mecanismos compensatorios y de mantenimiento de la homeostasis que hacen que no haya un mayor desarrollo tumoral en estas condiciones. Esto también puede atribuirse a la gran cantidad de vías moleculares que podrían estar afectándose en condiciones de la administración de una dieta alta en grasa.

Nuestra hipótesis planteaba además que el silenciamiento de CtBP1 induciría la expresión de BRCA1 intratumoral lo cual disminuiría el desarrollo tumoral. Sin embargo, los tumores desarrollados en condiciones de dieta grasa presentaban bajos niveles de expresión de BRCA1. Estos hallazgos sugieren que si bien el desarrollo tumoral es dependiente de CtBP1 la vía que está afectada no es fundamentalmente la de BRCA1. Probablemente, CtBP1 estaría co-reprimiendo otras proteínas que hacen que los tumores crezcan menos. Otra posibilidad es que el desbalance hormonal (andrógenos/estrógenos) generado en los animales alimentados con dieta grasa tenga algún efecto sobre el desarrollo tumoral.

A partir de estas observaciones nos planteamos nuevos interrogantes que buscaron responder este enigma. Una de las diferencias claves encontradas entre ambos tipos de tumores, fue la intensa expresión de e-caderina localizada en la membrana celular de los tumores generados a partir de las células PC3.shCtBP1 en condiciones de dieta hipercalórica respecto a los otros tipos de tumores desarrollados. Esta ampliamente descrito que CtBP1 actúa como un co-represor de la expresión de e-caderina, y en ese sentido, nuestros resultados estarían en concordancia con lo descrito en la literatura. Además, es posible que en los tumores PC3.shCtBP1 desarrollados en ratones alimentados con dieta grasa se encuentre activada la vía de EMT, mostrando tumores menos metastásicos. Sin embargo, aún queda mucho trabajo por realizar para tener un completo panorama de lo que estaría sucediendo en estos tumores.

Desde el punto de vista molecular, nos preguntamos qué vías y que moléculas estarían actuando diferencialmente en estos tipos de tumores que en la ausencia de CtBP1 provoquen una disminución en el crecimiento y desarrollo tumoral. En este sentido, estamos proyectando la realización de microarreglos de expresión en estos tumores para poder identificar las vías de señalización que se encontrarían diferencialmente activadas/apagadas. Existen en bibliografía varios reportes que muestran que la modulación de CtBP1 estaría involucrada en procesos sumamente importantes para el desarrollo tumoral. Por ejemplo, la presencia de CtBP1 promueve en tumores sólidos y en condiciones de hipoxia, un aumento en la migración celular al

modular la expresión de los genes de adhesión celular como e-caderina (Zhang et al, 2006). De esta manera también favorecería el desarrollo de metástasis; asimismo se lo encontró sobre-expresado en biopsias de tumores de metástasis de PCa (Wang et al, 2012). Por otro lado, también ha sido reportado que CtBP1 actúa como una proteína antiapoptótica en los tumores. Ha sido reportado que la pérdida de la expresión de CtBP1 conduce a un aumento en la apoptosis en células p53 deficientes (Zhang et al, 2003).

Otro abordaje experimental interesante desarrollado en este trabajo de tesis, fue la incubación de las células estables con medio de cultivo suplementado con el suero de los animales sometidos a las diferentes dietas. De esta manera, pudimos comprobar que la incubación de las líneas celulares de PCa que sobre-expresan CtBP1 con sueros provenientes de ratones alimentados con la dieta hipercalórica mostraban mayor viabilidad que las que se incubaron con los sueros controles. Esto último sería un indicio que en los animales que presentan una alta ingesta calórica podrían existir en circulación moléculas que contribuyen al aumento de la supervivencia y la proliferación celular. Como antes habíamos mencionado, el tejido adiposo es una fuente de moléculas que pueden aumentar la proliferación o desencadenar respuestas mitogénicas en las células que las reconozcan. Estas moléculas, tanto citoquinas como hormonas, serían capaces de activar diferentes vías moleculares en las células tumorales de esta manera permitiendo, no solo que proliferen sino que además se active los mecanismos de EMT y potencialmente la generación de metástasis.

Por lo tanto, basándonos en estudios previos (Di et al, 2010) en conjunto con nuestros resultados podemos proponer un modelo en el que la dieta grasa enciende un interruptor metabólico (CtBP1) el cual aumenta la proliferación de las células tumorales de próstata debido fundamentalmente a la represión de BRCA1. Sin embargo cuando este interruptor no está presente, la dieta grasa activa/apaga otros factores en forma independiente de la regulación de BRCA1, llevando a la inhibición del desarrollo tumoral; uno de estos factores probablemente sea la activación de E-caderina en la membrana celular en el tumor. En función de nuestros resultados y de las evidencias que se están acumulando en la actualidad con respecto a los síndromes metabólicos y el cáncer, creemos que nuestro aporte en este tema resulta relevante ya que relaciona el efecto de la dieta en la generación de estos síndromes metabólicos con los mecanismos moleculares capaces de detectar estas variaciones y modular la regulación de genes supresores de tumores como BRCA1 y E-caderina.

REFERENCIAS

- Abate-Shen C, Shen MM (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14: 2410-2434
- Abrahamsson PA, Cockett AT, di Sant'Agnese PA (1998) Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. *Prostate Suppl* 8: 37-42
- Agalliu I, Gern R, Leanza S, Burk RD (2009) Associations of high-grade prostate cancer with BRCA1 and BRCA2 founder mutations. *Clin Cancer Res* 15: 1112-1120
- Anderson SF, Schlegel BP, Nakajima T, Wolpin ES, Parvin JD (1998) BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet* 19: 254-256
- Andres JL, Fan S, Turkel GJ, Wang JA, Twu NF, Yuan RQ, Lamszus K, Goldberg ID, Rosen EM (1998) Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents. *Oncogene* 16: 2229-2241
- Angele S, Falconer A, Edwards SM, Dork T, Bremer M, Moullan N, Chapot B, Muir K, Houlston R, Norman AR, Bullock S, Hope Q, Meitz J, Dearnaley D, Dowe A, Southgate C, Ardern-Jones A, Easton DF, Eeles RA, Hall J (2004) ATM polymorphisms as risk factors for prostate cancer development. *Br J Cancer* 91: 783-787
- Aprelikova ON, Fang BS, Meissner EG, Cotter S, Campbell M, Kuthiala A, Besho M, Jensen RA, Liu ET (1999) BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11866-11871
- Balk SP, Ko YJ, Bublej GJ (2003) Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 21: 383-391
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Orntoft T, Lukas J, Bartek J (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434: 864-870
- Berkovich E, Ginsberg D (2003) ATM is a target for positive regulation by E2F-1. *Oncogene* 22: 161-167
- Bindra RS, Gibson SL, Meng A, Westermark U, Jasin M, Pierce AJ, Bristow RG, Classon MK, Glazer PM (2005) Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res* 65: 11597-11604
- Bindra RS, Glazer PM (2006) Basal repression of BRCA1 by multiple E2Fs and pocket proteins at adjacent E2F sites. *Cancer Biol Ther* 5: 1400-1407
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* 11: 68-76
- Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B (2004) Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101: 2371-2490
- 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
- Bui M, Reiter RE (1998) Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 17: 391-399
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276: 42462-42467
- Cabart P, Chew HK, Murphy S (2004) BRCA1 cooperates with NUFIP and P-TEFb to activate transcription by RNA polymerase II. *Oncogene* 23: 5316-5329
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85-95

- Cao Y, Ma J (2011) *Body Mass Index, Prostate Cancer-Specific Mortality, and Biochemical Recurrence: a Systematic Review and Meta-analysis*. *Cancer Prev Res (Phila)* 4: 486-501
- Carruba G (2006) *Estrogens and mechanisms of prostate cancer progression*. *Ann N Y Acad Sci* 1089: 201-217
- Castro E, Eeles R (2012) *The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer*. *Asian J Androl* 14: 409-414
- Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, Eeles R, Martin FL, Phillips DH, Crundwell M, Christmas T, Thompson A, Fisher C, Kovacs G, Cooper CS (2007) *Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate*. *Oncogene* 26: 2667-2673
- Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ (1999) *Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks*. *Science* 286: 1162-1166
- Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH (2008) *Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair*. *J Appl Genet* 49: 383-396
- Chapman MS, Verma IM (1996) *Transcriptional activation by BRCA1*. *Nature* 382: 678-679
- Cheetham PJ, Katz AE (2011) *Diet and prostate cancer - a holistic approach to management*. *Arch Esp Urol* 64: 720-734
- Chinnadurai G (2009) *The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors*. *Cancer Res* 69: 731-734
- De Luca P, Vazquez ES, Moiola CP, Zalazar F, Cotignola J, Gueron G, Gardner K, De Siervi A (2011) *BRCA1 loss induces GADD153-mediated doxorubicin resistance in prostate cancer*. *Mol Cancer Res* 9: 1078-1090
- 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
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG (2007) *Inflammation in prostate carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer* 7: 256-269
- De Nunzio C, Aronson W, Freedland SJ, Giovannucci E, Parsons JK (2012) *The correlation between metabolic syndrome and prostatic diseases*. *Eur Urol* 61: 560-570
- De Siervi A, De Luca P, Byun JS, Di LJ, Fufa T, Haggerty CM, Vazquez E, Moiola C, Longo DL, Gardner K (2010) *Transcriptional autoregulation by BRCA1*. *Cancer Res* 70: 532-542
- Debes JD, Tindall DJ (2002) *The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer*. *Cancer Lett* 187: 1-7
- Deng CX (2006) *BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution*. *Nucleic Acids Res* 34: 1416-1426
- Devore JL (2007) *Probability and Statistics for Engineers and the Sciences*. Brooks/Cole, Belmont, AZ
- Di LJ, Fernandez AG, De Siervi A, Longo DL, Gardner K (2010) *Transcriptional regulation of BRCA1 expression by a metabolic switch*. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1406-1413
- Douglas JA, Levin AM, Zuhlke KA, Ray AM, Johnson GR, Lange EM, Wood DP, Cooney KA (2007) *Common variation in the BRCA1 gene and prostate cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1510-1516
- Dupre A, Boyer-Chatenet L, Gautier J (2006) *Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex*. *Nat Struct Mol Biol* 13: 451-457

Eaton NE, Reeves GK, Appleby PN, Key TJ (1999) Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* 80: 930-934

Ellem SJ, Schmitt JF, Pedersen JS, Frydenberg M, Risbridger GP (2004) Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2434-2441

Fan C, Quan R, Feng X, Gillis A, He L, Matsumoto ED, Salama S, Cutz JC, Kapoor A, Tang D (2006) ATM activation is accompanied with earlier stages of prostate tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1090-1097

Fan Z, Chakravarty P, Alfieri A, Pandita TK, Vikram B, Guha C (2000) Adenovirus-mediated antisense ATM gene transfer sensitizes prostate cancer cells to radiation. *Cancer Gene Ther* 7: 1307-1314

Fjeld CC, Birdsong WT, Goodman RH (2003) Differential binding of NAD⁺ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9202-9207

Gallagher DJ, Gaudet MM, Pal P, Kirchoff T, Balistreri L, Vora K, Bhatia J, Stadler Z, Fine SW, Reuter V, Zelefsky M, Morris MJ, Scher HI, Klein RJ, Norton L, Eastham JA, Scardino PT, Robson ME, Offit K (2010) Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 16: 2115-2121

Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK (2000) Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* 60: 3299-3304

Gately DP, Hittle JC, Chan GK, Yen TJ (1998) Characterization of ATM expression, localization, and associated DNA-dependent protein kinase activity. *Mol Biol Cell* 9: 2361-2374

Ghosh S, George S, Roy U, Ramachandran D, Kolthur-Seetharam U (2010) NAD: a master regulator of transcription. *Biochim Biophys Acta* 1799: 681-693

Gillera JP, Putz O, DeJong M, DeJong S, Birch L, Pu Y, Huang L, Prins GS (2003) The role of prolactin in the prostatic inflammatory response to neonatal estrogen. *Endocrinology* 144: 2046-2054

Giovannucci E, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC (2007) Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 121: 1571-1578

Gleason DF (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50: 125-128

Gong Z, Agalliu I, Lin DW, Stanford JL, Kristal AR (2007) Obesity is associated with increased risks of prostate cancer metastasis and death after initial cancer diagnosis in middle-aged men. *Cancer* 109: 1192-1202

Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA, Jr., Kastrinakis NG, Levy B, Kleitman D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434: 907-913

Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA (1998) BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* 281: 1009-1012

Grooteclaes M, Deveraux Q, Hildebrand J, Zhang Q, Goodman RH, Frisch SM (2003) C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4568-4573

Gudas JM, Nguyen H, Li T, Cowan KH (1995) Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 55: 4561-4565

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674

- Harik LR, O'Toole KM (2012) Nonneoplastic lesions of the prostate and bladder. *Arch Pathol Lab Med* 136: 721-734
- Harkonen PL, Makela SI (2004) Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 297-305
- 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
- Hsing AW, Chokkalingam AP (2006) Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci* 11: 1388-1413
- Hubert A, Peretz T, Manor O, Kaduri L, Wienberg N, Lerer I, Sagi M, Abeliovich D (1999) The Jewish Ashkenazi founder mutations in the BRCA1/BRCA2 genes are not found at an increased frequency in Ashkenazi patients with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 65: 921-924
- Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J (2005) Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 58: 673-684
- Jack BH, Pearson RC, Crossley M (2011) C-terminal binding protein: A metabolic sensor implicated in regulating adipogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 693-696
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*
- Jiao W, Lin HM, Timmons J, Nagaich AK, Ng SW, Misteli T, Rane SG (2005) E2F-dependent repression of topoisomerase II regulates heterochromatin formation and apoptosis in cells with melanoma-prone mutation. *Cancer Res* 65: 4067-4077
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17: 16-23
- Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM (2011) Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* 11: 886-895
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27: 247-254
- Krieger JN, Nyberg L, Jr., Nickel JC (1999) NIH consensus definition and classification of prostatitis. *JAMA* 282: 236-237
- Kumar V, Carlson JE, Ohgi KA, Edwards TA, Rose DW, Escalante CR, Rosenfeld MG, Aggarwal AK (2002) Transcription corepressor CtBP is an NAD(+)-regulated dehydrogenase. *Mol Cell* 10: 857-869
- Lavin MF, Birrell G, Chen P, Kozlov S, Scott S, Gueven N (2005) ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res* 569: 123-132
- Lavin MF, Kozlov S (2007) ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6: 931-942
- Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM (2001) Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol* 159: 79-92
- Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, Saunders E, Dadaev T, Castro E, Goh C, Govindasami K, Guy M, O'Brien L, Sawyer E, Hall A, Wilkinson R, Easton D, Goldgar D, Eeles R, Kote-Jarai Z (2012) Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br J Cancer* 106: 1697-1701
- Levine AJ, Puzio-Kuter AM (2010) The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330: 1340-1344

- Liao CC, Tsai CY, Chang WC, Lee WH, Wang JM (2010) RB.E2F1 complex mediates DNA damage responses through transcriptional regulation of ZBRK1. *J Biol Chem* 285: 33134-33143
- Lieberman HB (2008) DNA damage repair and response proteins as targets for cancer therapy. *Curr Med Chem* 15: 360-367
- Liu AY, True LD, LaTray L, Nelson PS, Ellis WJ, Vessella RL, Lange PH, Hood L, van den Engh G (1997) Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10705-10710
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25: 402-408
- Ma J, Li H, Giovannucci E, Mucci L, Qiu W, Nguyen PL, Gaziano JM, Pollak M, Stampfer MJ (2008) Prediagnostic body-mass index, plasma C-peptide concentration, and prostate cancer-specific mortality in men with prostate cancer: a long-term survival analysis. *Lancet Oncol* 9: 1039-1047
- MacInnis RJ, English DR (2006) Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes Control* 17: 989-1003
- McGrowder DA, Jackson LA, Crawford TV (2012) Prostate cancer and metabolic syndrome: is there a link? *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 1-13
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66-71
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56: 185-229
- Monteiro AN, August A, Hanafusa H (1996) Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13595-13599
- Morio T, Kim H (2008) Ku, Artemis, and ataxia-telangiectasia-mutated: signalling networks in DNA damage. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 598-603
- Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 4: 511-518
- Mulholland DJ, Cox M, Read J, Rennie P, Nelson C (2004) Androgen responsiveness of Renilla luciferase reporter vectors is promoter, transgene, and cell line dependent. *Prostate* 59: 115-119
- Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188: 2033-2045
- Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB (2003) Prostate cancer. *N Engl J Med* 349: 366-381
- Niida H, Nakanishi M (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21: 3-9
- Park JJ, Irvine RA, Buchanan G, Koh SS, Park JM, Tilley WD, Stallcup MR, Press MF, Coetzee GA (2000) Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is a coactivator of the androgen receptor. *Cancer Res* 60: 5946-5949
- Patel AR, Klein EA (2009) Risk factors for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 6: 87-95
- Pena C, Garcia JM, Garcia V, Silva J, Dominguez G, Rodriguez R, Maximiano C, Garcia de Herreros A, Munoz A, Bonilla F (2006) The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int J Cancer* 119: 2098-2104

- Poehlmann A, Roessner A (2010) Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol Res Pract* 206: 591-601
- Price RS, Cavazos DA, De Angel RE, Hursting SD, Degraffenried LA (2012) Obesity-related systemic factors promote an invasive phenotype in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 15: 135-143
- Reynolds MA (2008) Molecular alterations in prostate cancer. *Cancer Lett* 271: 13-24
- Rodriguez C, Freedland SJ, Deka A, Jacobs EJ, McCullough ML, Patel AV, Thun MJ, Calle EE (2007) Body mass index, weight change, and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 63-69
- Rodriguez M, Yu X, Chen J, Songyang Z (2003) Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *J Biol Chem* 278: 52914-52918
- Rosen EM, Fan S, Ma Y (2006) BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett* 236: 175-185
- Santarosa M, Ashworth A (2004) Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654: 105-122
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749-1753
- Schaeper U, Boyd JM, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T, Chinnadurai G (1995) Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10467-10471
- Schayek H, Haugk K, Sun S, True LD, Plymate SR, Werner H (2009) Tumor suppressor BRCA1 is expressed in prostate cancer and controls insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) gene transcription in an androgen receptor-dependent manner. *Clin Cancer Res* 15: 1558-1565
- Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003) Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9: 437-448
- Selley S, Donovan J, Faulkner A, Coast J, Gillatt D (1997) Diagnosis, management and screening of early localised prostate cancer. *Health Technol Assess* 1: i, 1-96
- Shand RL, Gelmann EP (2006) Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol* 16: 123-131
- Shariat SF, Karam JA, Margulis V, Karakiewicz PI (2008) New blood-based biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer. *BJU Int* 101: 675-683
- Shen SX, Weaver Z, Xu X, Li C, Weinstein M, Chen L, Guan XY, Ried T, Deng CX (1998) A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene* 17: 3115-3124
- Siddiqui SA, Inman BA, Sengupta S, Slezak JM, Bergstralh EJ, Leibovich BC, Zincke H, Blute ML (2006) Obesity and survival after radical prostatectomy: A 10-year prospective cohort study. *Cancer* 107: 521-529
- Sims RJ, 3rd, Liss AS, Gottlieb PD (2003) Normalization of luciferase reporter assays under conditions that alter internal controls. *Biotechniques* 34: 938-940
- Smith JL, Freebern WJ, Collins I, De Siervi A, Montano I, Haggerty CM, McNutt MC, Butscher WG, Dzekunova I, Petersen DW, Kawasaki E, Merchant JL, Gardner K (2004) Kinetic profiles of p300 occupancy in vivo predict common features of promoter structure and coactivator recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11554-11559

- Somasundaram K (2003) Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair--perhaps through transcription. *J Cell Biochem* 88: 1084-1091
- Sonn GA, Aronson W, Litwin MS (2005) Impact of diet on prostate cancer: a review. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8: 304-310
- Spillman MA, Bowcock AM (1996) BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen. *Oncogene* 13: 1639-1645
- Sramkoski RM, Pretlow TG, 2nd, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, Marengo SR, Rhim JS, Zhang D, Jacobberger JW (1999) A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35: 403-409
- Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 336: 1401-1408
- Su F, Smilenov LB, Ludwig T, Zhou L, Zhu J, Zhou G, Hall EJ (2010) Hemizyosity for *Atm* and *Brc1* influence the balance between cell transformation and apoptosis. *Radiat Oncol* 5: 15
- Sundararajan S, Ahmed A, Goodman OB, Jr. (2011) The relevance of BRCA genetics to prostate cancer pathogenesis and treatment. *Clin Adv Hematol Oncol* 9: 748-755
- Taichman RS, Loberg RD, Mehra R, Pienta KJ (2007) The evolving biology and treatment of prostate cancer. *J Clin Invest* 117: 2351-2361
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454
- Thompson D, Easton DF (2002) Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 94: 1358-1365
- van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2: 196-206
- Wang Q, Zhang H, Fishel R, Greene MI (2000) BRCA1 and cell signaling. *Oncogene* 19: 6152-6158
- Wang R, Asangani IA, Chakravarthi BV, Ateeq B, Lonigro RJ, Cao Q, Mani RS, Camacho DF, McGregor N, Schumann TE, Jing X, Menawat R, Tomlins SA, Zheng H, Otte AP, Mehra R, Siddiqui J, Dhanasekaran SM, Nyati MK, Pienta KJ, Palanisamy N, Kunju LP, Rubin MA, Chinnaiyan AM, Varambally S (2012) Role of transcriptional corepressor CtBP1 in prostate cancer progression. *Neoplasia* 14: 905-914
- Warburg O (1956a) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269-270
- Warburg O (1956b) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314
- Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P, Gatei M, Stenzel D, Hobson K, Kozlov S, Zhang N, Farrell A, Ramsay J, Gatti R, Lavin M (1997) Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene* 14: 1911-1921
- Weisstein EW (2007) Error Propagation. From MathWorld -- A Wolfram Web Resource <http://mathworld.wolfram.com/ErrorPropagation.html> MathWorld 4-6- Wolfram Research, Inc Ref Type: Electronic Citation
- Westphal CH, Hoyes KP, Canman CE, Huang X, Kastan MB, Hendry JH, Leder P (1998) Loss of *atm* radiosensitizes multiple *p53* null tissues. *Cancer Res* 58: 5637-5639
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA (1967) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* 103: 514-527

- Wright ME, Chang SC, Schatzkin A, Albanes D, Kipnis V, Mouw T, Hurwitz P, Hollenbeck A, Leitzmann MF (2007) Prospective study of adiposity and weight change in relation to prostate cancer incidence and mortality. *Cancer* 109: 675-684
- Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, Chung LW (1994) Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer* 57: 406-412
- Xu B, Kim S, Kastan MB (2001) Involvement of *Bra1* in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 21: 3445-3450
- Xu CF, Chambers JA, Solomon E (1997) Complex regulation of the *BRCA1* gene. *J Biol Chem* 272: 20994-20997
- Ye Q, Hu YF, Zhong H, Nye AC, Belmont AS, Li R (2001) *BRCA1*-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol* 155: 911-921
- Yeh S, Hu YC, Rahman M, Lin HK, Hsu CL, Ting HJ, Kang HY, Chang C (2000) Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by *BRCA1* in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11256-11261
- Yoshida K, Miki Y (2004) Role of *BRCA1* and *BRCA2* as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95: 866-871
- Yu X, Wu LC, Bowcock AM, Aronheim A, Baer R (1998) The C-terminal (BRCT) domains of *BRCA1* interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *J Biol Chem* 273: 25388-25392
- Yun MH, Hiom K (2009) Understanding the functions of *BRCA1* in the DNA-damage response. *Biochem Soc Trans* 37: 597-604
- Zhang Q, Piston DW, Goodman RH (2002) Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* 295: 1895-1897
- Zhang Q, Wang SY, Nottke AC, Rocheleau JV, Piston DW, Goodman RH (2006) Redox sensor CtBP mediates hypoxia-induced tumor cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9029-9033
- Zhang Q, Yoshimatsu Y, Hildebrand J, Frisch SM, Goodman RH (2003) Homeodomain interacting protein kinase 2 promotes apoptosis by downregulating the transcriptional corepressor CtBP. *Cell* 115: 177-186
- Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439

APÉNDICE