



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia**

***“Rol de la hemoxigenasa 1 (HO-1) en cáncer colorrectal”***

**Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Biología de la Universidad Nacional del Sur**

**Licenciada en Ciencias Biológicas Nancy Carolina Andrés**

**Director: Dra. María Marta Facchinetti**

**Co-Director: Dr. Alejandro Carlos Curino**

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER - INIBIBB - CCT BAHÍA  
BLANCA ARGENTINA**

**2016**

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología del Cáncer del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), integrante del Centro Científico y Tecnológico Bahía Blanca (CONICET-UNS) durante el período comprendido entre el 01 de Marzo de 2011 al 1 de diciembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. María Marta Facchinetti, Investigadora Adjunta del CONICET y de la co-dirección del Dr. Alejandro Carlos Curino, Investigador Adjunto del CONICET.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por el CONICET (PIP 112-201101-00556, 112-200801-01794), por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)(PICT 2012-1595), por la por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC 2013) y por la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (SCGYT, UNS) (PGI 24/B172, 24/ZB31).

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de .....(.....)</p>
---	---

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi familia, a mis amigos y mentores que me han apoyado todo este tiempo que he trabajado en el presente escrito.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quizá sea la única oportunidad de ser leída por algunas personas, seguramente los mejores lectores/oyentes que podré encontrar. En este momento, miro algunos años atrás en busca de algún aprendizaje, y por supuesto que lo encuentro, de lo contrario sería reconocer que perdí mi tiempo, y sinceramente no lo creo así. Aprendí y me enriquecí de diferentes formas. En principio, mi objetivo con este trabajo era volcar todos mis conocimientos adquiridos como Licenciada en Biología y aportar mi granito de arena a la sociedad y al planeta; además, de aspirar al título de Doctora. Pero, con el paso de los años mi motivación cambió y se extendió a otros horizontes. Esta tesis no sólo significa el trabajo final para obtener un título de posgrado, representa mucho más, el esfuerzo no solo mío, sino el de muchas personas que me apoyaron materialmente (con conocimientos, material de estudio, herramientas, etc.) y logísticamente.

Algo que me debatí e incluso en estos momentos hago, es el orden en el cuál agradecer y qué motivos de clasificación definir, con lo cual me reservo el derecho del ordenamiento.

Agradezco al INIBIBB, por el soporte institucional, a la AGENCIA y al CONICET por financiar mis estudios de posgrado y a la UNS por brindarme la posibilidad de estudiar una carrera de posgrado.

Agradezco a mi directora de tesis, la Dra. María Marta Facchinetti y al Dr. Alejandro Carlos Curino co-director de la presente tesis, por haberme brindado un lugar en su laboratorio.

A mis supervisores de Holanda, Prof. Klaas Nico Faber, PhD y Prof. Gerard Dijkstra, MD PhD que tuve el gusto de cruzarme en mi formación, ejemplo de liderazgo y experiencia, un placer haber sido parte de su equipo de trabajo, gracias por su calidez humana, su comprensión, estímulo y experiencia.

A Tjasso Blokzijl, con quién tuve la suerte de estar bajo su guía desde el momento de mi arribo a Holanda; guardo grato recuerdo de su humor particular, dinamismo

y amplios conocimientos; excelente técnico e investigador, siendo su valor humano su mayor capital.

A Sergio Zalba, gracias por escucharme, guiarme y estar, por tratar de re-direccionar la aguja cuando la brújula se imantaba. Excelente profesional y ser humano.

Especialmente a mis padres y hermano, por su apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera y de mi vida. Gracias por ser la instigación continua a seguir siempre adelante y luchar por mis objetivos, por acompañarme en todo este proceso y, principalmente, gracias por darme el privilegio de ser su hija y hermana.

Tincho, amigo, gracias por arreglarme siempre la compu, elemento fundamental para el trabajo y adoptar a Kenay y quererlo aún con el coagulo corrido, me ayudaste un montón.

Santi, amigo del alma, gracias porque la pasamos juntas a todas, y en todos lados, y seguimos paraditos los dos y lo principal: ¡¡juntos!!

Diego, tus vivencias hicieron que mis puertas se abrieran y tuve el privilegio de ver tu nobleza y encontrar una gran persona. Hoy compañero y amigo, quedan varios proyectos juntos.

A Claudeta y Norita, seres hermosos con quienes compartí charlas, experiencias, momentos en forma de melodías y arte, el mundo se ve diferente con una visión pentagramada.

Gracias a mis amigos y familia en general, sin ustedes no podría hacer sinapsis con el mundo, gracias por hacerme saber y nunca dudar de mí, en cada paso que doy sé que sus manos están tendidas. Gracias simplemente por ser.

A mis amigos de ayer hoy y siempre, no los nombro porque son muchos y siempre están en mi corazón, me han apoyado desde diferentes ámbitos en forma incondicional, como amigos, oyentes, psicólogos colaborando con pequeñas -

grandes trabas tanto técnicas como personales que se me presentaron en el camino.

A todas aquellas personas que no cité pero contribuyeron de algún modo a que esta tesis haya llegado a buen término.

¡¡¡¡A todos muchas gracias!!!!

Nancy C. Andrés

## RESUMEN

La expresión de hemoxigenasa 1 (HO-1) ha demostrado estar sobre-regulada en el cáncer colorrectal (CCR), pero el papel que desempeña en este tipo de cáncer aún no se ha dilucidado. Los objetivos de este estudio han sido analizar la expresión de HO-1 en CCR invasivo humano, evaluar su correlación con parámetros clínicos -histopatológicos e investigar los mecanismos por los cuales la enzima influye en la progresión tumoral. Se confirmó que HO-1 fue sobre-expresada en CCR invasivo humano y se encontró que la expresión de la enzima se asocia con un mayor tiempo de supervivencia global de los pacientes. Además, se observó, en un modelo de CCR en ratas inducido químicamente con 1,2-dimetilhidrazina que la expresión total y nuclear de HO-1 aumenta con la progresión tumoral. El estudio de los mecanismos implicados en la acción de la HO-1 en CCR demostró que la proteína reduce la viabilidad celular a través de la inducción de la detención del ciclo celular y de la apoptosis; y que se requiere la proteína supresora de tumores p53 funcional para estos efectos. Esta reducción en la viabilidad celular se acompaña por la modulación de los niveles de p21, p27, ciclina D1, Bax, uPARP y por la modulación de las vías de caspasa-3, Akt y PKC's. También, en modelos animales murinos, se demostró que la modulación genética y farmacológica de HO-1 reduce la tasa de crecimiento y la carga tumoral cuando p53 se encuentra en su estado salvaje. En adición, se observó que la sobre-expresión de HO-1 reduce la migración e invasión celular. En conclusión, estos resultados demuestran un papel antitumoral de HO-1 apuntando a la importancia de la condición de p53 en esta actividad antitumoral.

## **ABSTRACT**

The expression of heme oxygenase-1 (HO-1) was shown to be up-regulated in colorectal cancer (CRC), but its role in this type of cancer has not yet been elucidated. The objectives of this study were to analyze the expression of HO-1 in human invasive CRC, to evaluate its correlation with clinical-histopathological parameters and to investigate the mechanisms by which the enzyme affects tumor progression. It was confirmed that HO-1 was over-expressed in invasive human CRC and was found that the expression of the enzyme is associated with an increased overall survival time of patients. Furthermore, it was observed in a chemical animal model of CRC induced in rats with 1,2-dimethylhydrazine that the total and the nuclear expression of HO-1 increased with tumor progression. The study of the mechanisms involved in the action of HO-1 protein in CRC, showed that the protein reduces cell viability through induction of cell cycle arrest and apoptosis; and functional suppressor protein p53 is required for this purpose. This reduction in cell viability is accompanied by modulation of the levels of p21, p27, cyclin D1, Bax, uPARP and modulation of caspase-3, Akt and PKC's pathways. Also, in animal murine models, it was demonstrated that genetic and pharmacological modulation of HO-1 reduces the rate of growth of tumors and the tumor load when wild type p53 is present. In addition, we observed that overexpression of HO-1 decreases migration and cell invasion. Altogether, this results show an antitumor role of HO-1 pointing to the importance of p53 status with its antitumor activity.

## ABREVIATURAS

ADN ácido desoxirribonucleico

Akt Proteína quinasa B

AJCC American Joint Committee on Cancer

AV anexina V

ANOVA análisis de la varianza

APS amonio persulfato

ARN ácido ribonucleic

ARNm ácido ribonucleico mensajero

ATB antibiótico-antimicótico

AUC área debajo de la curva

BME  $\beta$ -Mercaptoetanol

BSA suero albumino bovino

Ca<sup>2+</sup> calcio

CaCl<sub>2</sub> cloruro de calcio

CCND1 ciclina D1

CCNE ciclina E

cDNA ácido desoxirribonucleico complementario

CO<sub>2</sub> dióxido de carbono

CM Componentes apoptóticos

DAPI 4',6-diamino-2-fenilindol

DMEM Dolbecco's Modified Eagle Medium

DMSO dimetil sulfóxido

ECL electroquimioluminiscencia

EDTA etilen-diamintetra-ácido acético

EGFR receptor del factor de crecimiento epidérmico

FACS fluorescence-activated cell sorter analysis

FW foward

GH grado histológico

GMNM glándula mamaria no maligna

GN grado nuclear

h horas

H Hemina

H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> agua destilada

Hmox-1 gen de HO-1

IF inmunofluorescencia

IgG-HRP Horseradish Peroxidase-Conjugated Antibodies

IHQ inmunohistoquímica

IM Índice Mitótico

IN Índice Nuclear

INC Instituto Nacional del Cáncer

IP ioduro de propidio

IRS score inmunoreactivo

K potasio

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  fosfato de potasio monobásico LB medio Luria Bertani

LOH pérdida de heterocigosidad

Min minutos

MG matrigel

M extensión de las metástasis

N status de los ganglios linfáticos

$\text{N}_2$  nitrogeno

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sodio fosfato dibásico

NaCl cloruro de sodio

ND no disponible

NF-Kappa-B factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Nrf2 NFE2-related factor 2

OMS organización mundial de la salud

p21Cip1 Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1<sup>a</sup>

p27kip1 inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina

PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida

PARP poly (ADP-ribose) polymerase

PBS buffer fosfato salino

p21Cip1 Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1<sup>a</sup>

p27kip1inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina

PKC  $\beta$  Protein kinase C beta type

PFA para formaldehído

pRB proteína del retinoblastoma

Rb retinoblastoma

RB reactivo de Bradford

ROS Reactive Oxygen Species

RPMI Roswell Park Memorial Institute

Rpm revoluciones por minuto

SD desviación estándar

SDS duodecil sulfato de sodio

Seg segundos

SFB suero fetal bovino

SG sobrevida global

SOD superóxido dismutasa mitocondrial

T tumor

TAE tris acetato EDTA

TBS tris bufer salino

TBS-T tris bufer salino Tween-20

TEMED N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina TMA microarreglo de tejidos

TRIS tris (hidroximetil) aminometano

TritonX-100 octil fenoxi polietoxietanol

Tween-20 polioxietileno (20) sorbitan monolaurato

UV ultra violeta

V vehículo

WB Western blot

ZT zona tumoral

## ÍNDICE

PREFACIO .....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS .....	4
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
ABREVIATURAS.....	9
ÍNDICE .....	14
INTRODUCCIÓN .....	17
Cáncer .....	17
<i>Generalidades</i> .....	17
<i>Historia del Cáncer</i> .....	19
<i>Epidemiología</i> .....	22
<i>Epidemiología del cáncer colorectal</i> .....	24
<i>Fisiología y anatomía del intestino grueso</i> .....	25
Patogénesis .....	28
<i>Historia natural del CCR</i> .....	28
<i>Estadificación del CCR</i> .....	29
Cáncer, inductor de estrés oxidativo.....	32
Marcadores moleculares.....	36
<i>Hemoxigenasa (HO)</i> .....	37
<i>HO-1 y Cáncer</i> .....	46
<i>HO-1 y CCR</i> .....	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
Hipótesis General .....	49
Objetivo General.....	49
Objetivos Específicos .....	49
MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
Reactivos .....	51
<i>Tratamientos con hemina y estaño (IV) protoporfirina IX (SnPP)</i> .....	52
<i>Anticuerpos</i> .....	52
Líneas celulares.....	53
Biopsias de neoplasias humanas .....	53

Modelos animales.....	55
<i>Inducción química (DMH) de CCR en ratas Wistar</i> .....	55
<i>Implante subcutáneo de células humanas de CCR en modelos murinos inmunocomprometidos</i> .....	55
Técnicas Histológicas.....	56
<i>Procesamiento de órganos y tumores para histología</i> .....	56
<i>Evaluación del Índice mitótico (IM) y del Índice nuclear (IN)</i> .....	57
Inmunohistoquímica (IHQ).....	58
Evaluación de la intensidad de la tinción y análisis estadístico.....	59
Transfecciones.....	60
<i>Transfección transitoria y estable</i> .....	60
<i>Transfección de células con Lipoafectamina</i> .....	60
<i>Transformación de bacterias competentes</i> .....	61
<i>Aislamiento de ADN plasmídico</i> .....	61
Ensayos de viabilidad celular.....	62
<i>Análisis de viabilidad celular mediante conteo de células en cámara de Neubauer</i> .....	62
<i>Análisis de viabilidad celular mediante xCELLigence™ System/RT-CESTM System</i> .....	62
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	63
Ensayos de apoptosis.....	64
<i>Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo</i> .....	64
<i>Análisis de apoptosis mediante la medición de la actividad de caspasa-3</i> .....	65
Ensayo de Toxicidad.....	65
Migración celular.....	65
Invasión celular.....	66
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE) y <i>western blot</i> .....	67
<i>Preparación de lisados celulares</i> .....	67
<i>Medición de la concentración de proteínas</i> .....	67
<i>Preparación de las muestras</i> .....	67
<i>Electroforesis</i> .....	68
<i>Transferencia a membrana de PVDF</i> .....	69
<i>Inmunodetección de proteínas</i> .....	69
Inmunofluorescencia.....	70
<i>Análisis estadístico</i> .....	71

RESULTADOS .....	72
Validación del anticuerpo para HO-1 por inmunohistoquímica y análisis de la expresión de HO-1 en biopsias de CCR humanos. ....	72
HO-1 se asocia con mayor tiempo de supervivencia global de los pacientes con CCR invasivo. ....	74
En estadios avanzados del modelo animal de inducción química de CCR, aumenta la expresión de HO-1 y transloca a núcleo .....	78
La sobre-expresión genética de HO-1 reduce la carga tumoral y se reafirma la localización nuclear en un modelo murino de CCR. ....	80
La localización nuclear de HO-1 también se observa en una línea celular de CCR y en tejidos humanos .....	87
HO-1 disminuye la viabilidad de líneas de células CCR .....	88
La sobre-expresión de la HO-1 en células que tienen el gen supresor de tumores p53 en estado salvaje produce una disminución de la carga tumoral en modelos murinos de CCR. ....	95
La sobreexpresión de HO-1 provoca la detención del ciclo celular, apoptosis y un aumento de la actividad de caspasa-3. ....	104
La hemina no es toxica a 100 µM .....	107
HO-1 modula importantes vías en el CCR.....	107
HO-1 modula la migración celular de la línea celular HCT116. ....	109
HO-1 modula la invasión celular de la línea celular HCT116 y HCT116pcDNA3-HO-1. ....	110
Los pacientes con alta expresión de HO-1 y p53 salvaje tienen una sobrevida global alta.....	113
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN .....	115
BIBLIOGRAFÍA .....	128
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS .....	152
Publicaciones.....	152
Trabajos en colaboración presentados en reuniones científicas .....	152
<i>Nacionales</i> .....	152
<i>Internacionales</i> .....	153

# INTRODUCCIÓN

## Cáncer

### Generalidades

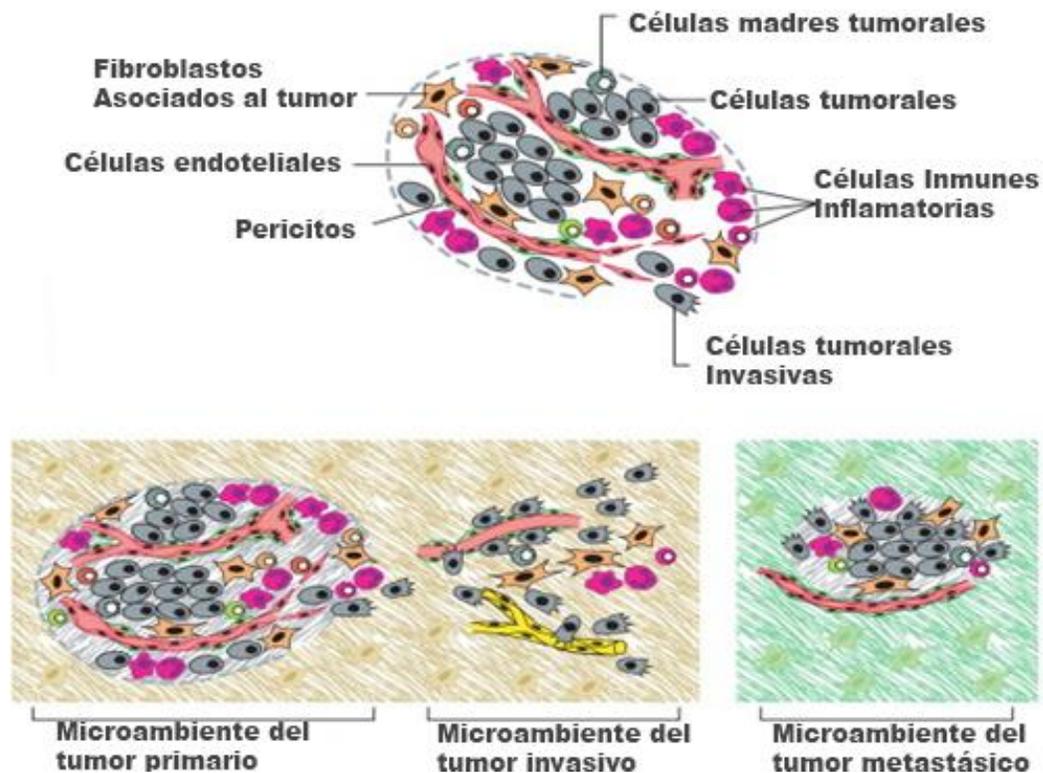
La transformación maligna y la progresión tumoral son procesos de varias etapas sucesivas que distan de estar completamente dilucidadas. La investigación, en el área de la biología del cáncer, está demostrando que esta enfermedad es una acumulación clonal de células que presentan una sucesión de alteraciones genéticas y epigenéticas en los circuitos que regulan su comportamiento normal. Estas alteraciones llevan a que las células adquieran una serie de capacidades necesarias para transformarse en células cancerosas y completar la progresión tumoral. Así, de acuerdo a la hipótesis de las *capacidades adquiridas* (Hanahan y Weinberg, 2011) se ha postulado que es necesario que las células malignas adquieran ocho capacidades y dos características facilitadoras para generar un tumor y completar la progresión del cáncer (Figura 1).



**Figura 1. Capacidades adquiridas y características facilitadoras que llevan al desarrollo completo del cáncer.** Tomado y adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011.

Las ocho capacidades incluyen: activación anormal y sostenida de señales proliferativas, evasión de señales supresoras del crecimiento y de la proliferación celular, evasión de la apoptosis, adquisición de inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, reprogramación del metabolismo energético, evasión de la respuesta inmune y activación de los mecanismos de invasión y metástasis. Las dos características facilitadoras son la inestabilidad genética, la cual provee la diversidad genética que acelera la adquisición de las ocho capacidades anteriores y la inflamación que actúa como un importante promotor que facilita la adquisición de las mismas (Hanahan y Weinberg, 2000; 2011).

Sin embargo, los tumores están constituidos por algo más que grupos de células que proliferan descontroladamente debido a la adquisición de las capacidades anteriormente descritas. Durante la última década, los tumores han sido reconocidos como órganos de gran complejidad cuya biología puede entenderse mediante el estudio de los distintos tipos de células individuales especializadas dentro del tumor, así como también mediante el estudio de un *microambiente tumoral* que ellas construyen durante el transcurso de las distintas etapas de la tumorigénesis a través de interacciones heterotípicas (Hanahan y Weinberg, 2011, Figura 2). Sin embargo, el conocimiento de esta red de interacciones entre las diferentes células del microambiente tumoral sigue siendo escaso ya que la mayoría de las moléculas de señalización y las vías implicadas, aún no han sido identificadas.



**Figura 2. Las células del microambiente tumoral.** Tomado y adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011.

### ***Historia del Cáncer***

La batalla contra el cáncer, no es un tema moderno, esta lucha viene sosteniéndose a lo largo de la existencia del ser humano. Se han encontrado signos de cáncer en huesos de momias egipcias y peruanas que datan de más de 3000 años a.C. En 1962, Edwin Smith encontró en Lúxor, Egipto, el documento más antiguo del cual se tiene constancia, en el cual se describen ocho casos de cáncer de mama o úlceras tratadas con cauterización. También hace referencia a que *no hay tratamiento* para el cáncer (Morton et al, 1997).

Fue Hipócrates quien por primera vez utilizó la palabra *karcinos* y *carcinoma* para describir a los tumores. El término *cáncer*, deriva del griego *karkinos* (relativo al cangrejo), está asociado a los vasos sanguíneos de los tumores o el crecimiento de las células con la forma del cuerpo del cangrejo (The American Society Inc,

2002, 2005). Hipócrates (400 a.C.), conocido como el padre de la Medicina, propuso la *Teoría Humoral de la Medicina*, en ella se describen los cuatro fluidos o humores que componen el cuerpo: sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra. Cualquier cambio en el balance de estos humores, causaría cáncer; principalmente el exceso de bilis negra.

En 168 a.C., Galeno, médico romano, también apoyó la teoría de los humores. Él sostuvo que en etapas precoces, el cáncer podía ser curado, y que los tumores avanzados podrían ser curados operándolos cortando alrededor del área afectada o por cauterización. Galeno, además consideraba que la dieta poco saludable y el estilo de vida, estaban relacionadas con el cáncer (Gurunluoglu et al, 2003).

M. Maimónides (1190 d.C.), autor de diez tratados de Medicina, fue el primero que sugirió que los tumores grandes, podrían ser curados por escisión más allá de su raíz y del tejido sano de su alrededor (Rosner et al, 1998). En 1713 d.C., Bernardino Ramazzini notó entre las monjas, una ausencia de cáncer de cuello uterino y una elevada frecuencia de cáncer de mama, concluyendo que el cáncer podría ser causado por el estilo de vida. Su aporte, también llevó a descubrir la importancia de los factores hormonales en el cáncer (The American Society Inc, 2002, 2005).

Giovani Morgagni (1761) ayudó a fundar el estudio del cáncer cuando relacionó por primera vez la enfermedad con los hallazgos patológicos. Perciwal Pott descubrió en 1775 que la acumulación de hollín aumentaba el riesgo de padecer cáncer de escroto en los trabajadores de las chimeneas, lo que llevó al estudio de la exposición ocupacional a carcinógenos (Morton et al, 1997; The American Society Inc, 2002; 2005).

En 1779, se fundó el primer Hospital de Cáncer en la ciudad de Reims, Francia, el cual poco después fue removido del centro de la ciudad por la creencia de que el cáncer era contagioso (Morton et al, 1997).

A principios del siglo XIX Joseph Claude Reclaire (1829) reconoce por primera vez las metástasis cancerígenas y Johannes Müller (1838) sienta las bases para establecer la histología patológica como un brazo independiente de la ciencia, demostrando que el cáncer está constituido por células (Morton et al, 1997). Entre

1863 y 1867, Rudolph L.K. Virchow, escribió por primera vez siete artículos y un trabajo de tres volúmenes sobre tumores malignos (Britanic Online, 2005). Posteriormente, Alexander Freund, llevó a cabo con éxito la primera histerectomía abdominal en un cáncer de útero (Morton et al, 1997); y Theodore Billroth en 1881, realizó la primera resección de cáncer pilórico, y de esófago por cáncer (Castiglioni et al, 1941).

En la década del 90 del siglo XIX, Steven Paget, propuso su teoría del cáncer *semilla y sólido*; analizó varias autopsias de mujeres con cáncer de mama y descubrió que el patrón de metástasis no era al azar. Así propuso que la célula tumoral (semilla) tendría una afinidad por ciertos órganos (sólidos), por lo cual la metástasis sería el resultado de la compatibilidad de esa *semilla* con su *sólido* (Pantel et al, 1999; Fidler et al, 2002).

En 1890 William Steward Halsted, realizó la primera mastectomía radical en el cáncer de mama (Udwablia et al, 2000). Por su parte, en 1895, Wilhelm C. Röntgen descubre los Rayos-X que permitieron la detección de tumores corporales en etapas tempranas (Morton et al, 1997).

En 1914 Theodore Boveri propuso la *Teoría de la Mutación Somática del Cáncer* que postulaba que el cáncer era causado por cromosomas animales (Udwabia et al, 2000); mientras que Johannes Andreas Crib Fibiger, ganó el Premio Nobel de 1926, por su trabajo *Los nematodos causan cáncer en ratones* (Raju et al, 1998).

En 1946, Louis Goodman, estudió al agente químico de la mostaza nitrogenada, descubriendo su uso terapéutico en ciertos tipos de cánceres como el linfoma de Hodgkin, linfosarcomas y leucemias (Goodman et al, 1984). En 1976 Howard Temin, propuso la hipótesis del DNA provirus en el cáncer, refiriéndose a que ciertos ARN virus podrían ser capaces de insertarse en el material genético de la célula huésped, llevando así al desarrollo de cáncer. En 1976 Harold E. Verms y John M. Bishop descubrieron el primer oncogen celular, el *src* (Marx et al, 1989); mientras que Friend y colaboradores (1986) aislaron el primer gen supresor de tumores *Rb* (por retinoblastoma). Dicho gen también fue el primero en ser asociado con una forma familiar de cáncer.

En 1995, se realiza la primera técnica de microarreglos de ADN para medir la expresión genética en plantas. Esta tecnología se usaría posteriormente para detectar cánceres humanos y caracterizar la sensibilidad de células tumorales a los tratamientos oncológicos (Wulfskuhle et al, 2004).

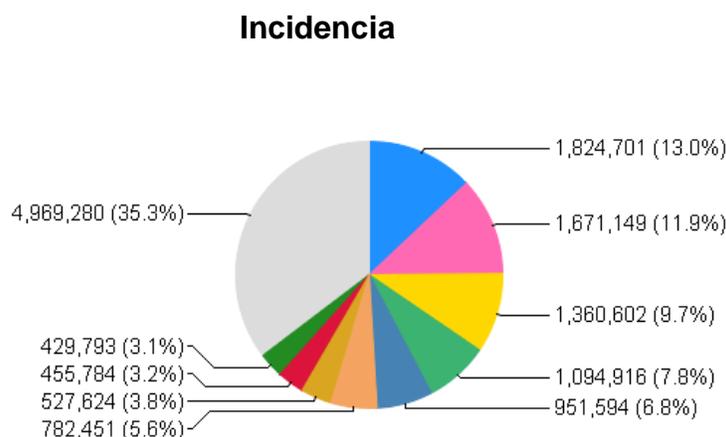
Hahn y colaboradores logran en 1999 transformar por primera vez una célula epitelial humana y un fibroblasto en una célula tumoral.

### ***Epidemiología***

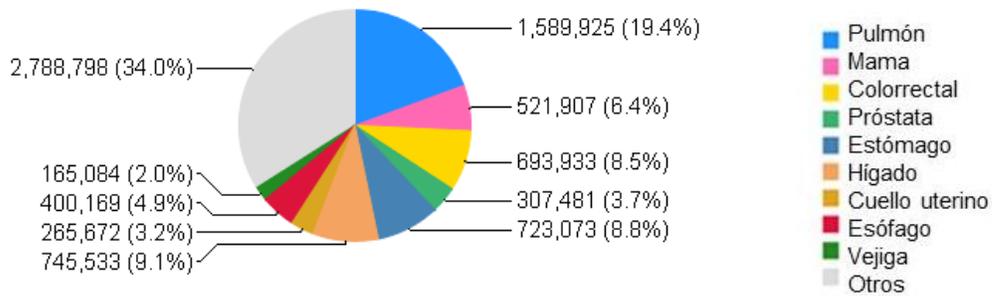
El cáncer, a nivel mundial, es un serio problema de salud ya que, según datos del 2012 de la IARC (International Agency for Research on Cancer), se produjeron 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, 8,2 millones de muertes por cáncer y 32,6 millones de personas que viven con cáncer (Ferlay et al, 2013).

Contrariamente a la creencia de que el cáncer sólo es un problema en los países desarrollados, el 57% de los nuevos casos y el 65% de las muertes se produjeron en los países en desarrollo (Jemal et al, 2011; Ferlay et al, 2013).

En el mundo, los cánceres más frecuentes y de mayor mortalidad en mujeres y hombres son el de pulmón, en primer término, y luego mama y colorrectal (Figura 3).



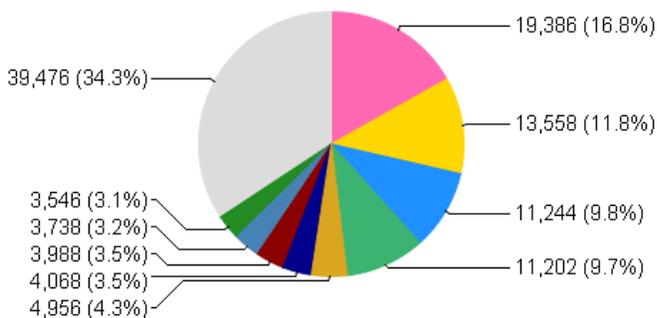
### Mortalidad



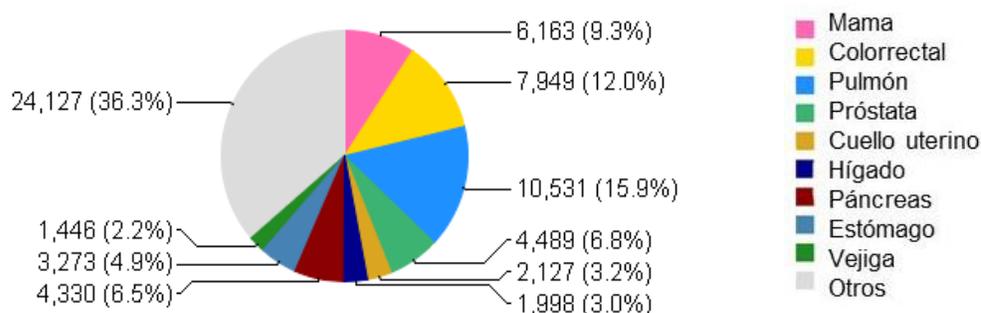
**Figura 3. Tasas de incidencia y mortalidad en el mundo para ambos sexos.** Número de casos o muertes estimadas por cada 100.000 personas por año. Proyecto GLOBOCAN 2012. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

Los datos de incidencia de cáncer en la Argentina, estimados por la IARC, muestran que durante el año 2012 se produjeron 115.200 nuevos casos de tumores malignos (excluyendo aquellos localizados en piel y con histología distinta a la del melanoma), que corresponden a una incidencia de 216,68 casos nuevos por año cada 100.000 individuos (Ferlay et al, 2010; 2013; Figura 4).

### Incidencia



## Mortalidad



**Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer en Argentina para ambos sexos.** Número de casos o muertes estimadas por cada 100.000 personas por año. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

## Epidemiología del cáncer colorrectal

El CCR es uno de los tumores con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, con una proyección y preocupación crecientes para las próximas décadas.

En Argentina, en el año 2012 se detectaron 13.558 casos nuevos de CCR, de los cuales 7.237 fueron hombres y 6.321 mujeres, lo que representa una tasa de incidencia ajustada por edad de 23,77 cada 100.000 habitantes (Ferlay et al, 2013).

En el año 2012, el CCR representa la segunda causa de muerte por cáncer en el país, con 7.949 defunciones que constituyen el 12% del total de muertes por tumores malignos (DEIS, Ministerio de Salud de la Nación. Argentina, 2014) y una tasa bruta de mortalidad de 13 por 100.000 habitantes, y varía significativamente entre jurisdicciones.

Existen datos de incidencia suministrados por los Registros de Cáncer de Base Poblacional (RCBP) provinciales en algunas jurisdicciones que permiten una aproximación acerca de la distribución geográfica de la incidencia del CCR. Las tasas más elevadas se registran en La Pampa, Entre Ríos y Bahía Blanca.

## ***Fisiología y anatomía del intestino grueso***

Para comprender mejor la salud del sistema digestivo y del colon, resulta útil conocer las distintas partes que conforman este órgano y sus funciones específicas.

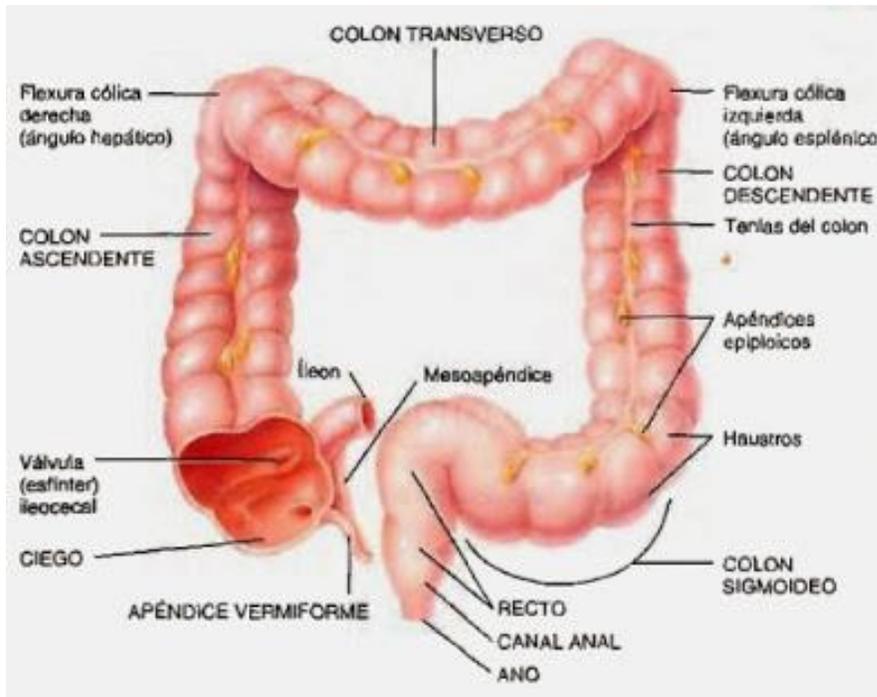
El intestino grueso continúa al íleon, extendiéndose desde el orificio ileal (válvula ileocecal) hasta el ano. El ciego es la porción inicial del intestino, se encuentra junto con el apéndice vermiforme. Se continúa con el colon ascendente, que abarca desde el ciego hasta la flexura cólica derecha (o hepática). Allí gira alrededor de 90 grados hacia la parte media del cuerpo y continúa a través del abdomen como colon transversal hasta la flexura cólica izquierda (o esplénica) donde vuelve a girar 90 grados y toma el nombre de colon descendente; manteniendo un trayecto paralelo al colon ascendente hasta la cresta ilíaca. Progresivamente se inclina hacia la línea media para continuarse con el colon sigmoideo, antes de comunicarse con el recto. El canal anal es la porción terminal del intestino grueso (Moore et al, 2010; Figura 5).

La fracción colónica derecha (ciego, colon ascendente, flexura cólica hepática y mitad derecha de colon transversal) está irrigada por la arteria mesentérica superior y recibe fibras simpáticas y parasimpáticas del plexo que rodean a la arteria, mientras que la izquierda (mitad izquierda de colon transversal, flexura cólica esplénica, colon descendente y sigmoideo) es irrigada por la arteria mesentérica inferior y recibe fibras simpáticas y parasimpáticas del plexo que rodea a dicha arteria (Moore et al, 2010).

Las venas llevan un curso análogo al de las arterias y van a confluir en la vena mesentérica inferior, que se une a la esplénica y mesentérica superior para formar la vena porta hepática.

En la morfología externa se distinguen tenias cólicas, que consisten en fibras musculares longitudinales. Se originan en el apéndice vermiforme y desaparecen a nivel rectal. Tiene un aspecto abollado o lobulado debido a la presencia de haustras cólicas, que son dilataciones en forma de sacos. En la superficie del

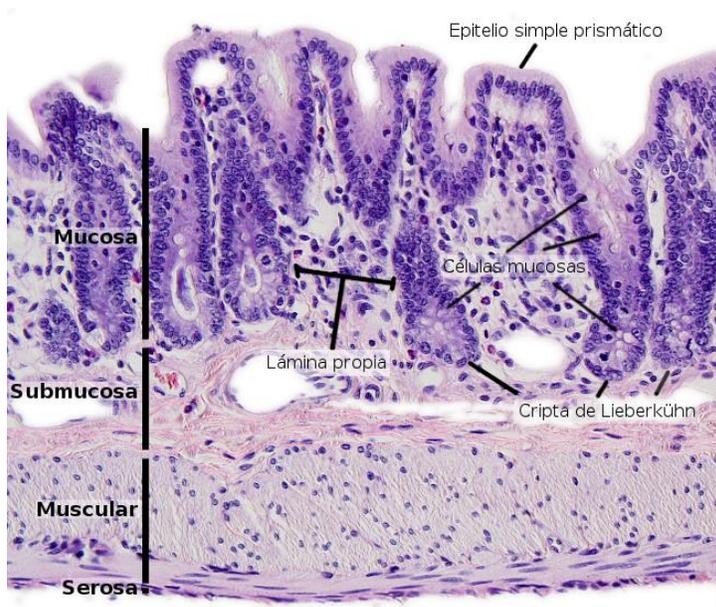
colon fijado a las tenias, se encuentran masas adiposas cubiertas por peritoneo, denominadas apéndices omentales o epiploicos (Moore et al, 2010).



**Figura 5. Vista del intestino grueso que muestra las estructuras principales.**

Tomado de <http://www.anatolandia.com/2014/01/intestino-craso-o-grueso-sistema-digestivo.html>

Histológicamente, se diferencian cuatro capas. La más interna es la mucosa, suele ser gruesa, con células regenerativas, enteroendócrinas, caliciformes y absortivas. Alrededor de la mucosa se dispone una capa de vasos sanguíneos, nervios y tejido conectivo conocida como submucosa. Alrededor de la submucosa se encuentra la muscular con una capa circular interna y otra longitudinal externa. Finalmente, la serosa forma la capa más externa; es una capa delgada de tejido epitelial escamoso simple que segrega líquido seroso acuoso para lubricar la superficie del intestino grueso (Moore et al, 2010; Figura 6).



**Figura 6. Capas del Intestino grueso.** Secciones de parafina de intestino grueso de rata (*Rattus norvegicus*) teñidas con hematoxilina-eosina. Tomado de Atlas de Histología Vegetal y Animal. Universidad de Vigo: <http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-grueso.php?pagina=20>.

Las funciones básicas del intestino grueso se resumen en la Tabla 1.

Estructura	Actividad	Funciones
Luz	Actividad bacteriana	Degradan los hidratos de carbono, proteínas y pigmentos no digeridos en productos más simples.
Mucosa	Secreta moco Absorción	Lubrica el colon y protege la mucosa. Absorción del agua que solidifica a las heces y contribuye al equilibrio de agua corporal.
Muscular	Propulsión haustral  Peristalsis Peristalsis en masa Reflejo de defecación	Mueve el contenido de un haustra a otra mediante contracciones musculares.  Mueve el contenido a lo largo de todo el colon. Fuerza el contenido hacia el colon sigmoides y recto. Elimina las heces por contracciones del colon sigmoides y el recto.

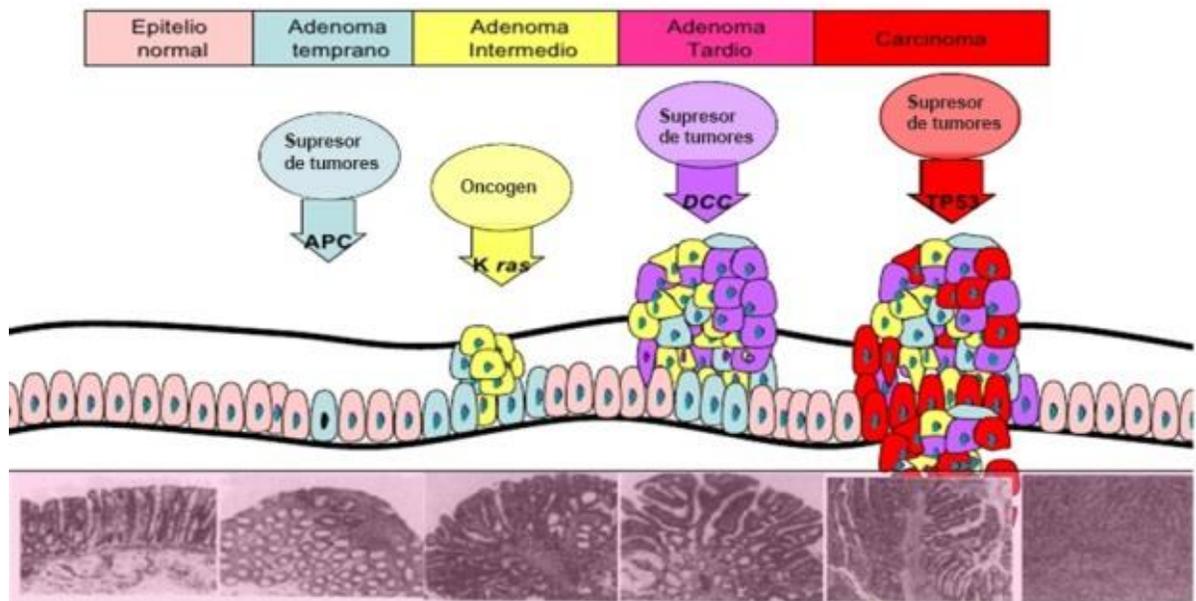
**Tabla 1. Resumen de las funciones básicas del intestino grueso.**

## Patogénesis

### *Historia natural del CCR*

Aunque se suele hablar de cáncer colorrectal, el término engloba a dos tumores de comportamiento muy diferente: cáncer de colon y cáncer de recto. La mayoría de los cánceres colorrectales aparecen sobre un pólipo pre-existente en la mucosa del colon o del recto, que con el paso del tiempo y debido a la acción de distintos agentes sobre él, evoluciona a un tumor maligno.

Los pólipos son pequeños tumores benignos que aparecen en la mucosa del colon y del recto. Suelen ser bastante frecuentes en la población de más de 50 años. Existen dos modelos de carcinogénesis en el CCR: la vía *supresora* o de la inestabilidad cromosómica (clásica) y la vía *mutadora* o de inestabilidad microsatelital (alternativa). La vía clásica es el modelo de progresión Adenoma – Carcinoma descrito por Fearon y Volgestein en 1990 (Figura 7). La vía mutadora se caracteriza por mutaciones en los genes que habitualmente se encargan de la reparación de errores en el ADN, se inactivan y en el material genético aparecen multitud de errores que conducen a la formación de una gran cantidad de mutaciones. Las mutaciones más frecuentes son: APC 60%, p53 70%, DCC 70%, KRAS 40% y BAX 50%. (Kelsen et al, 2008).



**Figura 7. Secuencia de las alteraciones genéticas en el cáncer colorrectal.** La secuencia adenoma-carcinoma. El paso inicial en la carcinogénesis colorrectal se cree que es la formación de focos de criptas aberrantes (ACF). La activación de la vía *Wnt* se produce durante este paso, como resultado de la inactivación de mutaciones en el gen *APC*. La progresión de adenoma y carcinoma es generalmente mediada por la activación de mutaciones en *K-RAS* y la pérdida de expresión *P53*, respectivamente. Un subconjunto de adenomas avanzados puede progresar debido a mutaciones en *PIK3CA* y pérdida de 18q. Tomado y adaptado de Fearon y Vogelstein, 1990.

### ***Estadificación del CCR***

La etapa (estadio) describe la extensión del cáncer en el cuerpo. Para el cáncer colorrectal, la etapa se basa en cuán lejos el cáncer ha crecido hacia la pared del intestino, si ha alcanzado o no las estructuras cercanas, o si se ha propagado o no a los ganglios linfáticos o hacia órganos distantes. El estadio tumoral es uno de los factores más importantes para determinar el pronóstico y las opciones de tratamiento. La clasificación por etapas (estadificación) es el proceso de determinar hasta dónde se ha propagado el cáncer.

Existen dos sistemas de clasificación que se utilizan con igual frecuencia en el cáncer de colon y recto:

1. Clasificación TNM o AJCC (American Joint Committee on Cancer)
2. Clasificación de Astler y Coller

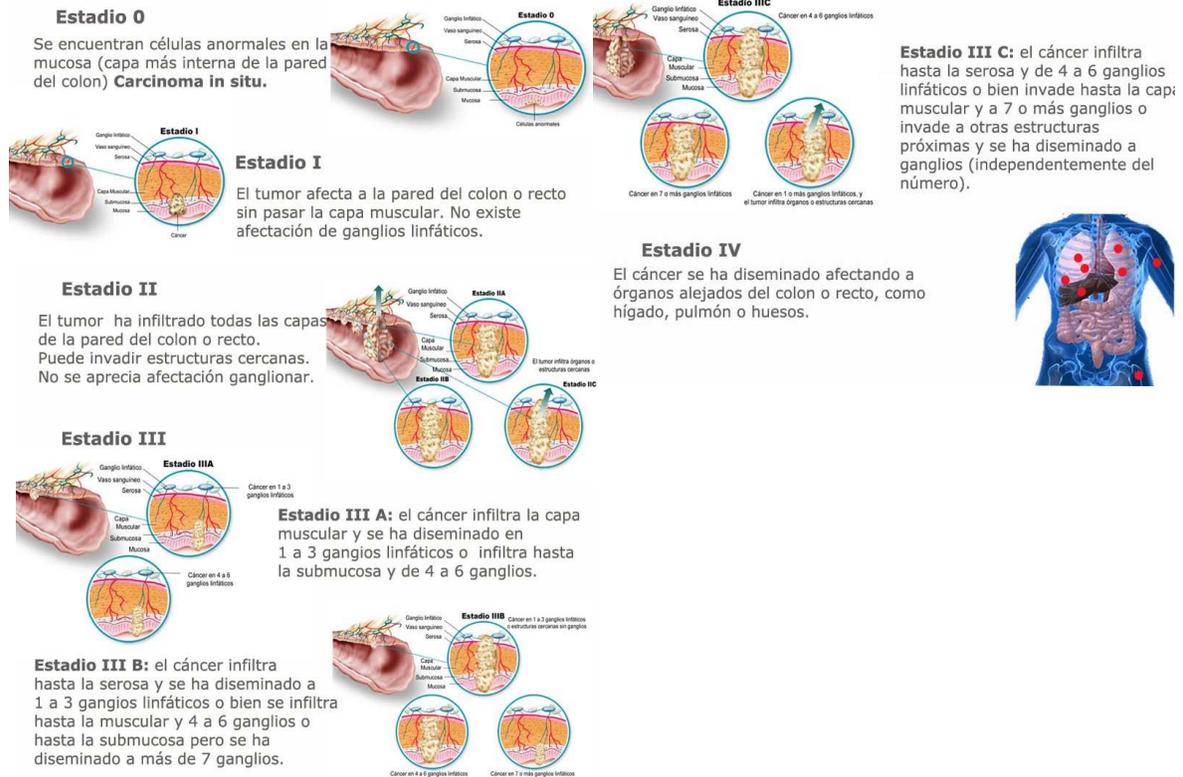
### ***Sistema de clasificación por etapas del AJCC***

El sistema de clasificación por etapas del cáncer colorrectal es el que establece el American Joint Committee on Cancer (AJCC). También se conoce como el sistema TNM. El sistema TNM describe tres piezas clave de información:

- La letra T describe cuán lejos el tumor primario ha crecido hacia la pared del intestino y si ha crecido hacia las áreas adyacentes.
- La letra N describe la extensión de la propagación a los ganglios (nódulos) linfáticos regionales.
- La letra M indica si el cáncer se ha propagado (ha producido metástasis) a otros órganos del cuerpo. El cáncer colorrectal se puede propagar a casi cualquier parte del cuerpo, pero los lugares más comunes de propagación son el hígado y los pulmones.

El estadio tumoral es uno de los factores más importantes para determinar el pronóstico y las opciones de tratamiento. Para ello, asociada a las letras mencionadas, se utiliza una escala numérica de cinco estadios (0 a IV) que indica la gravedad del tumor en orden ascendente (Figura 8).

## Fases del cáncer colorrectal



**Figura 8. Esquema de los estadios según la clasificación TNM.** Tomado y adaptado de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) <https://www.aecc.es>.

### **Clasificación de Dukes o Astler y Coller**

En esta clasificación se utilizan las letras que van desde la A hasta la D (Tabla 2).

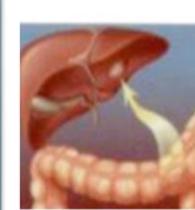
Estadio A: lesión limitada a la mucosa, sin afectación ganglionar.

Estadio B1: el tumor afecta a parte de la pared del colon o recto, sin atravesarla ni afectar ganglios.

Estadio B2: afecta a toda la pared sin invasión ganglionar.

Estadio C: la enfermedad puede afectar a parte o a toda la pared, con afectación ganglionar.

Estadio D: existe afectación de otros órganos alejados.

TNM	Estadio I	II	III	IV
	T <sub>1-2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	T <sub>3-4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	T <sub>1-4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>0</sub>	T <sub>1-4</sub> N <sub>1-2</sub> M <sub>1</sub>
DUKES	Dukes A	Dukes B	Dukes C	Dukes D
Desarrollo de la enfermedad				
Sobrevida a 5 años estimada	95%	80%	50%	5%
Estadio al diagnóstico (%)	37%		63%	

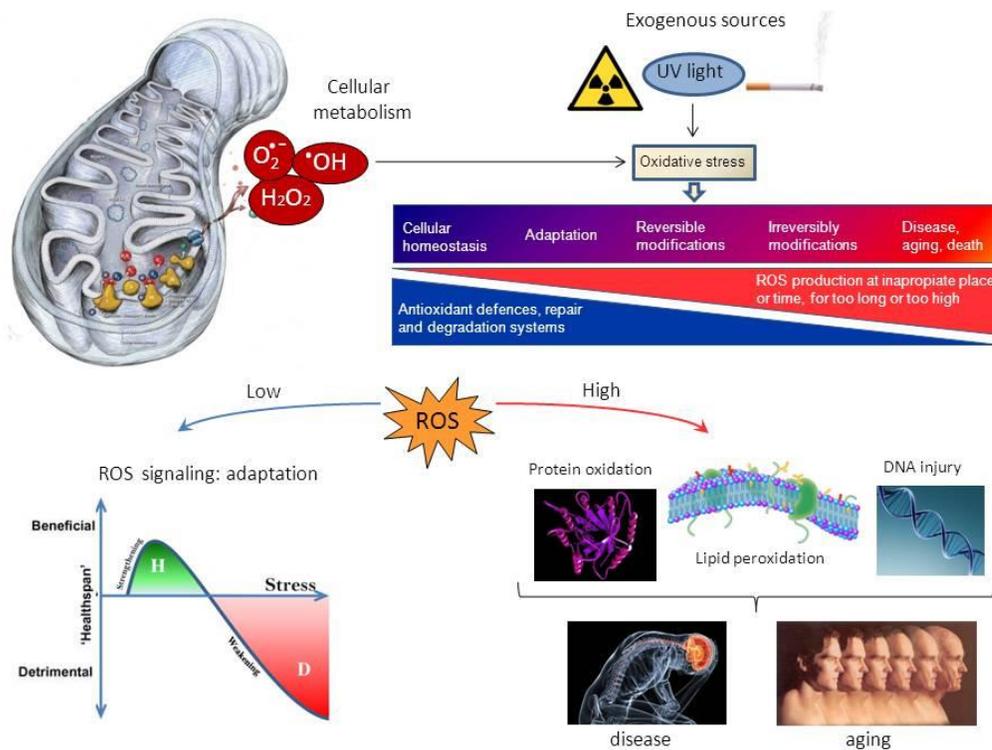
**Tabla 2. Estadificación del cáncer colorrectal con la clasificación basada en los sistemas TNM y de Dukes y sobrevida a 5 años.** Tomado y adaptado de las XVI Jornadas de Actualización Oncológicas, Dr. Claudio Gabriel Fermani (MAAC) Sección de Coloproctología Servicio de Cirugía General, Hospital Luis C. Lagomaggiore.

### Cáncer, inductor de estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una situación bioquímica que se caracteriza por el desequilibrio entre los radicales libres, principalmente las especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno, y los mecanismos de defensa antioxidantes. El entorno normal reductor de la célula se preserva por la acción de las enzimas mitocondriales que mantienen el estado reducido. Las ROS son altamente reactivas debido a que presentan un número desigual de electrones de valencia. El primer radical libre que se forma por reducción del oxígeno molecular, es el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), cuya toxicidad es moderada. Éste, de forma espontánea o a través de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD), se convierte en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual se transforma en el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), altamente tóxico. La principal fuente de ROS se encuentra en los componentes de la cadena

de transporte electrónico: NADPH oxidasa, xantina oxidasa, lipooxigenasa, citocromo P-450 y prostaglandina endoperóxido sintasa (Viñas et al, 2012).

Las ROS tienen un papel dual en los sistemas biológicos y en el desarrollo de enfermedades. Por un lado, a concentraciones bajas, las ROS tienen una función fisiológica participando en la respuesta a agresiones externas, como por ejemplo las infecciones, e interviniendo en algunas vías de señalización celular. Por otro lado, a concentraciones elevadas, pueden interactuar con macromoléculas celulares como los lípidos de membrana, las proteínas y el ADN, ocasionando un daño oxidativo irreversible y alterando las funciones vitales de la célula (Viñas et al, 2012, Figura 9).



**Figura 9. Fuentes exógenas de estrés y generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante el metabolismo celular.** Efecto dual a nivel celular: a concentraciones elevadas produce oxidación irreversible de macromoléculas; a dosis bajas induce la activación de sistemas antioxidantes y de adaptación (H, hormesis). Tomado de [http://www.sebbm.es/web/images/archivos/archivos\\_tinymce/junio2014\\_elisacabiscol.pdf](http://www.sebbm.es/web/images/archivos/archivos_tinymce/junio2014_elisacabiscol.pdf).

Los efectos nocivos de las ROS son contrarrestados por los sistemas de defensa antioxidante.

El cáncer es *per se* una enfermedad inductora de estrés oxidativo. Las células tumorales producen mayor cantidad de ROS que las células normales (Hileman et al, 2004). Algunos estudios han observado que pacientes con cáncer avanzado presentan concentraciones plasmáticas de ROS más elevadas que los individuos sanos, mientras que los niveles de actividad enzimática de algunos sistemas antioxidantes como glutatión peroxidasa y SOD se hallan disminuidos (Sharma et al, 2009; Stachowicz-Stencel et al, 2011) y otros aumentados, como HO-1 (Sánchez et al, 2005; Otero Regino et al, 2009; Miyata et al, 2014; Lee-Young, 2015).

Los mecanismos por los cuales las células neoplásicas presentan niveles de ROS más elevados que las células normales pueden ser múltiples. Las necesidades metabólicas de las células neoplásicas son mayores, por lo que requieren mayores cantidades de ATP producido por las mitocondrias, para mantener su elevado ritmo de crecimiento y proliferación. La síntesis desmedida de ATP mitocondrial contribuye a la producción de ROS. A esto se le añade que las células tumorales utilizan en mayor grado la vía de la glucólisis para la síntesis de ATP (efecto *Warburg*) (Warburg, 1956). Esta alteración en el funcionamiento mitocondrial, favorece el escape de electrones desde el complejo respiratorio hacia el citoplasma, originándose una mayor cantidad de radicales libres intracelulares (Pelicano et al, 2006). Al estrés oxidativo generado por las alteraciones metabólicas de las células neoplásicas se le añade la producción de grandes cantidades de ROS por parte de las células inflamatorias que infiltran el tejido tumoral y que incrementan el estrés oxidativo en el microambiente tumoral (Essick y Sam, 2010). A todos estos factores, hay que añadirles los radicales libres generados por los tratamientos oncológicos específicos como la quimioterapia y/o la radioterapia (Kikawa et al, 2010).

En relación con las mutaciones, estas pueden producirse en el próximo ciclo de replicación del ADN por fallos en los mecanismos de reparación del daño

oxidativo, encargados del mantenimiento de la integridad de esta molécula. Si las mutaciones ocurren en genes críticos en el desarrollo del cáncer, en células germinales pueden dar lugar a un incremento del riesgo de cáncer en la descendencia. Por otra parte, si las mutaciones afectan estos genes críticos en células somáticas, pueden originar el cáncer. Los genes críticos para el cáncer son fundamentalmente aquellos que regulan la expresión o codifican a proto-oncogenes y genes supresores del tumor. Los proto-oncogenes están presentes en el ADN de las células normales, pero las mutaciones pueden originar su activación y conversión en oncogenes, los cuales estimulan la proliferación celular. El carácter dominante de estos genes provoca que la mutación en solo uno de los alelos pueda conducir al cáncer. Por otra parte, las mutaciones que inhiben la expresión o afectan la estructura y función de genes supresores del tumor, también pueden conducir a la proliferación celular incontrolada (García Triana et al, 2013).

### ***CCR y estrés oxidativo***

El estrés oxidativo constituye un mecanismo fundamental en la génesis de cáncer colorrectal, dando lugar a las mutaciones que convierten las células en cancerosas.

Un estudio publicado por Crespo Sanjuán (2012) reveló que los niveles de oxidación, aumentan de forma global en cada estadio de la fase tumoral, desde la aparición de un pólipo hasta el estadio IV, en relación con la población control. En este estudio, todos los individuos afectados por la enfermedad, presentaron niveles elevados de oxidación. Estos niveles elevados pueden ser identificados por los altos niveles de LDL oxidada en suero y de mieloperoxidasa, y bajos niveles del antioxidante  $\beta$ -caroteno, que se encuentran marcadamente disminuidos en los enfermos con pólipos displásicos y siguientes estadios. El proceso de oxidación comienza en la fase de pólipo y los individuos con pólipo displásicos tienen menores niveles en sangre de antioxidantes lo que podría predisponer a un mayor estrés oxidativo y por tanto a mayores mutaciones que pueden degenerar

en cáncer. Aquellos sujetos con estados oxidativos más elevados tienen una menor supervivencia.

### **Marcadores moleculares**

Los marcadores tumorales son indicadores bioquímicos de la presencia de un tumor. Incluyen antígenos de superficie celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas y hormonas. Su principal utilidad en la medicina clínica ha sido como prueba de laboratorio que apoya al diagnóstico, y tienen valor para determinar la respuesta a la terapia y para indicar la recidiva durante el periodo de seguimiento. La identificación de marcadores moleculares, permitiría identificar a pacientes con buen pronóstico respecto a los de peor pronóstico, reduciendo el número de intervenciones quirúrgicas; también permitiría seleccionar fármacos y diseñar tratamientos con el objetivo de mejorar las respuestas y con ello poder impactar en su supervivencia (Gascón, 2009).

La mayoría de los marcadores tumorales pueden ser producidos tanto por células normales, como por células cancerosas, incluso en pequeñas cantidades. Su sensibilidad está relacionada con el número de células y su acceso a la circulación; de ahí que esté íntimamente ligada al estadio tumoral. En general, la mayoría de los marcadores son poco sensibles en estadios iniciales. Por el contrario, su sensibilidad y especificidad se incrementa notablemente en estadios avanzados.

El pronóstico de los pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal está claramente relacionado con la penetración tumoral en la pared intestinal, el compromiso ganglionar y la presencia o ausencia de metástasis. Además, también se consideran como indicadores de mal pronóstico la presencia al diagnóstico de obstrucción y/o de perforación intestinal, un valor elevado del antígeno carcinoembrionario (CEA) prequirúrgico y la presencia de invasión vascular venosa, linfática o perineural (Compton et al, 2004). Las mutaciones en el gen K-ras y en el p53 se correlacionan con una mayor agresividad tumoral. La estadificación histopatológica a partir de la observación microscópica del tejido tumoral

representa el estándar diagnóstico y pronóstico aceptado, además de ser la principal guía para la elección del tratamiento (Liefers et al, 2002). Sin embargo, tumores con igual clasificación histopatológica pueden presentar importantes diferencias en la progresión y respuesta al tratamiento (Van de Vijver et al, 2002; Lam et al, 2005). Esto refleja la necesidad de hallar nuevos marcadores moleculares que ayuden al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de este tipo de cáncer.

### ***Hemoxigenasa (HO)***

La HO fue descubierta en 1968 cuando Tenhunen y colaboradores (1968) describieron el mecanismo de la reacción para el catabolismo del hemo. La HO es la enzima que cataliza el paso limitante en la degradación oxidativa del hemo (Tenhunen et al, 1969), generando cantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), biliverdina e iones  $Fe^{2+}$  (Tenhunen et al, 1968) (Figura 11). EL CO se libera en la respiración, la biliverdina es convertida por la biliverdina reductasa en bilirrubina, la cual puede ser oxidada por las enzimas del citocromo P450, la bilirrubina entra en reacción enzimática con un derivado de la glucosa para luego ser eliminado en la orina y el hierro libre induce la expresión de la ferritina que lo secuestra y activa a la Fe-ATPasa, disminuyendo de esta manera su contenido intracelular.

La enzima mantiene la homeostasis celular, disminuye el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, mediante la descomposición de grupo hemo que es un importante pro-oxidante y pro-inflamatorio y por la actividad de los productos que libera. Todos los productos de la reacción enzimática de HO ejercen efectos pleiotrópicos, incluyendo numerosas respuestas citoprotectoras (Takahashi et al, 2009). El CO es un importante mensajero celular, y ejerce efectos anti-apoptóticos y anti-inflamatorios a través de la guanilato ciclasa que evita la agregación plaquetaria, disminuye la adhesión entre leucocitos, también suprime la producción de  $TNF\alpha$ , de  $IL-1\beta$  y de la quimioquina CCL4 (proteína  $1\beta$  inflamatoria

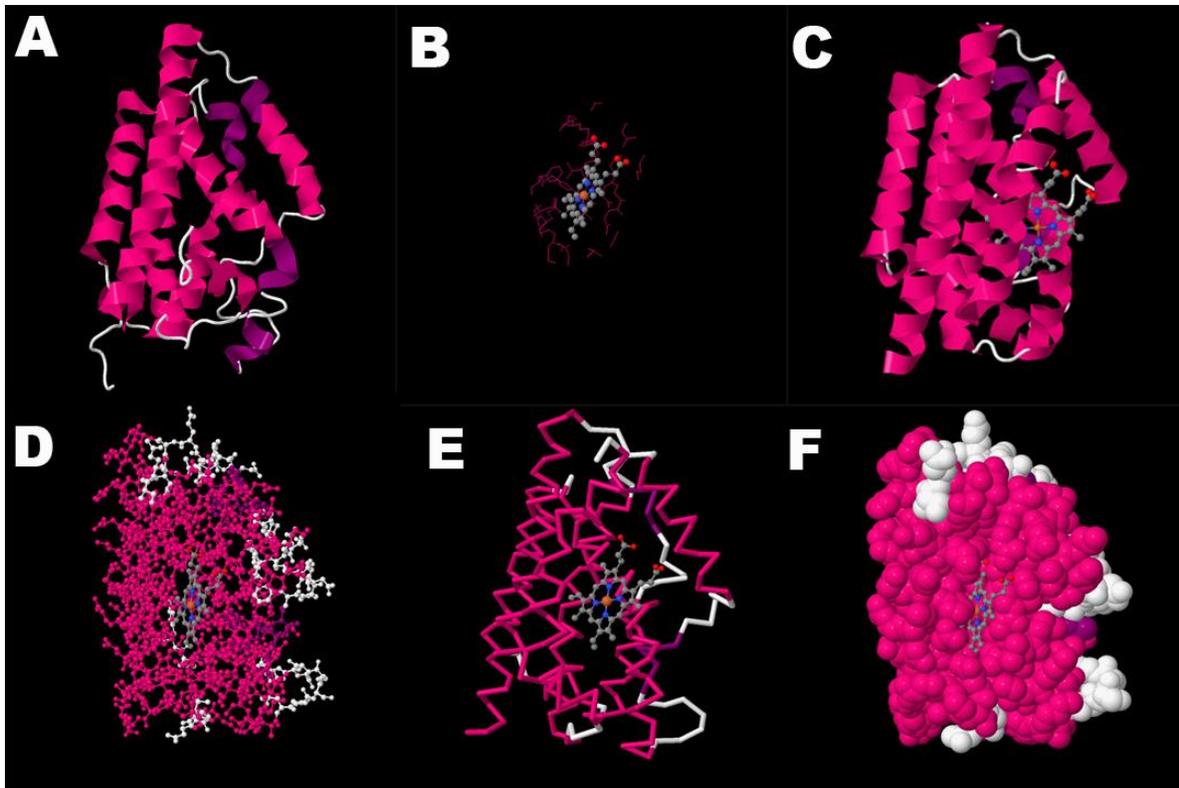
de macrófago) y a su vez activa la síntesis de la interleuquina antiinflamatoria IL-10 (Otterbein et al, 2000).

El segundo producto, el hierro ferroso puede producir la liberación de radicales de O pero actúa la ferritina y la Hierro ATPasa.

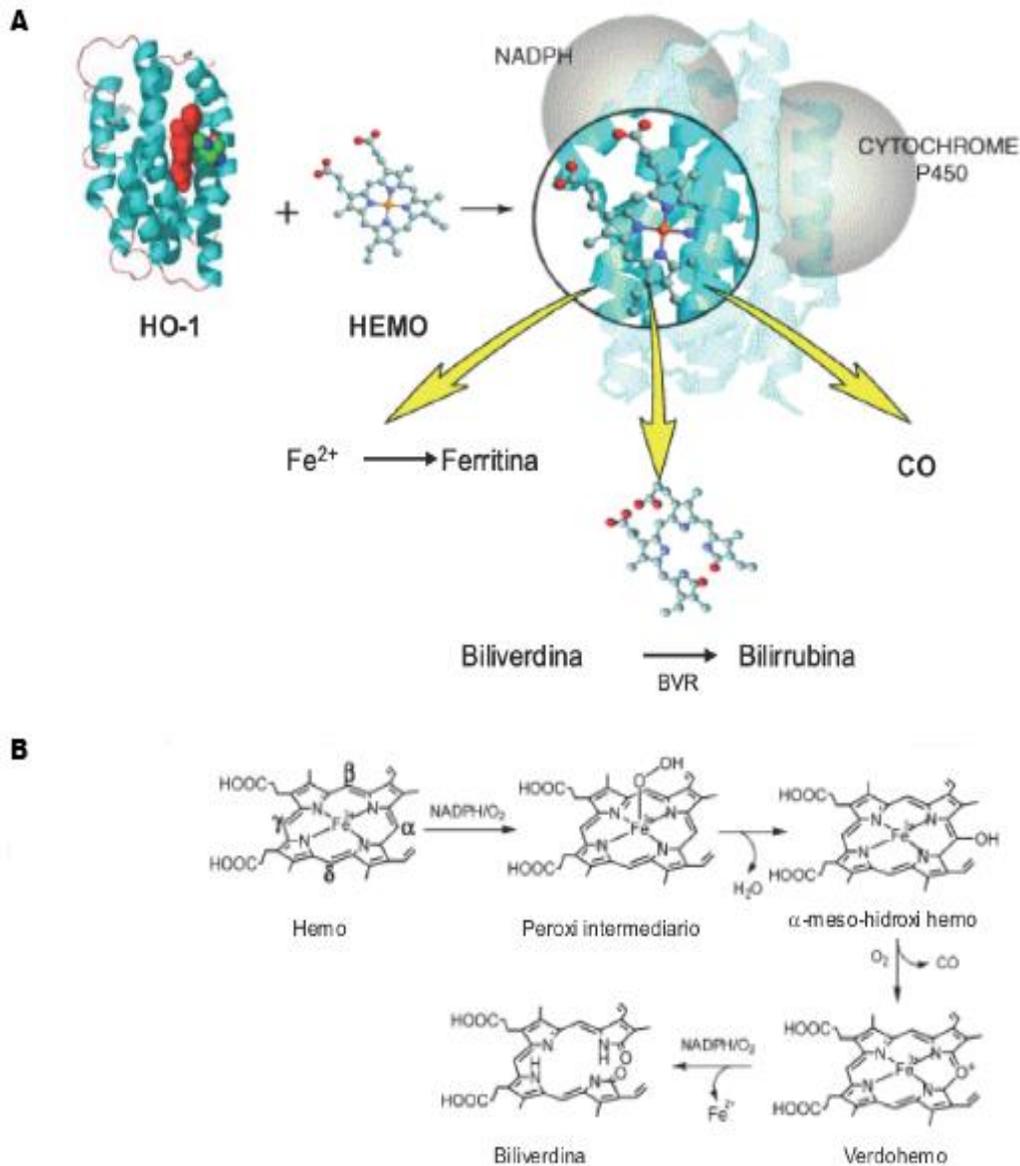
La biliverdina y bilirrubina a pesar que su acumulación se considera toxica, son inhibidores de la cascada del complemento y disminuyen la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo, son los scavenger endógenos más potentes de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Stocker et al, 1987) y de radicales peróxidos evitando así, la peroxidación los lípidos y proteínas de la membrana (Jozkowicz et al, 2007).

### ***Catabolismo del grupo hemo***

El sistema HO se une a su sustrato en una posición específica del bolsillo proteico para formar el complejo hemo-enzima (Figura 10). En presencia de O<sub>2</sub>, la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa transporta electrones desde el NADPH al complejo hemo-enzima. HO y NADPH-citocromo P450 reductasa necesitan estar asociadas para transferir dichos electrones (Figura 11A). La activación del O<sub>2</sub> es llevada a cabo por el sustrato hemo y sus dos intermediarios, α-meso-hidroxihemo y verdohemo (Kikuchi et al, 2005b; Figura 11B). Luego se produce la apertura del anillo tetrapirrólico de hemo por clivaje del puente α-meso-carbono, y se liberan tres productos biológicamente activos para la célula: biliverdina, CO y Fe<sup>2+</sup>. Posteriormente la biliverdina es rápidamente convertida a bilirrubina por medio de la biliverdina reductasa (BVR) (Tenhunen et al, 1970). Los iones Fe<sup>2+</sup> y la bilirrubina están relacionados con el balance redox celular (Galbraith, 1999).



**Figura 10. Estructura tridimensional de HO-1 humana. A.** Estructura cristalina de la apo HO-1. **B.** Bolsillo proteico que se forma en el complejo hemo-enzima. **C-F.** HO-1 en el complejo con su sustrato, el grupo hemo. Tomado y adaptado de Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1N45&opt=3&bionumber=1>.



**Figura 11. Acción enzimática de la Hemo oxigenasa-1.** **A.** la HO-1 cataliza la etapa limitante en la degradación del grupo hemo, liberando cantidades equimolares de CO, biliverdina y Fe<sup>2+</sup>. **B.** Ciclo catalítico de la HO. El paso clave es la hidroxilación inicial para dar el  $\alpha$ -mesohidroxi hemo. Este paso requiere dos electrones del NADPH, vía NADPH-citocromo P450 reductasa. Los pasos siguientes que conducen a verdohemo y biliverdina son únicos de la hemo oxigenasa. Tomado y adaptado de Otterbein et al, 2003; Poulos, 2005.

## ***Isoformas***

Se han identificado tres isoformas de HO hasta la fecha: HO-1, HO-2, y HO-3 (Tabla 3); tienen distintos patrones de expresión génica específica de cada tejido (Prawan et al, 2005).

Se conoce poco sobre HO-3. Comparte un 90% de homología con HO-2 y fue detectada únicamente en cerebro de rata. No es catalíticamente activa y no se expresa en seres humanos. Se ha sugerido que podría tener un rol regulatorio en procesos que son dependientes de hemo (McCoubrey et al, 1997; Hayashi et al, 2004).

HO-2 se encuentra expresada en forma constitutiva en la mayoría de los tejidos: cerebro, hígado, bazo y testículos (Maines et al, 1986; Trakshel et al, 1986; Maines, 1997; Maines, 2005b) y es altamente expresada en tejidos neuronales que contribuyen a la homeostasis celular.

La HO-1, también conocida como una proteína de choque térmico-32 (HSP32), es una enzima inducible y se expresa en niveles bajos en la mayoría de los tejidos. HO-1 es extremadamente sensible, no sólo a metales pesados sino a todo tipo de estímulos y agentes que causan estrés oxidativo y condiciones patológicas, incluyendo isquemia, hemorragias, shock térmicos, hipoxia, radiación UV, especies reactivas de oxígeno (ROS)(Zhu et al, 2010).

Característica	HO-1	HO-2
Tipo de expresión	Inducible	Constitutiva
PM (KD)	32	36
Km*	0.24 $\mu$ M	0.40 $\mu$ M
Vmax*	3.4 $\mu$ mol/mg/h	0.24 $\mu$ mol/mg/h
Sitios regulatorios	NFkB, Nrf2, AP-1, AP-2, C/EBP, USF, MRE, HSE	Glucocorticoides
Sensibilidad al calor (pérdida de actividad a 60°C, 10 min)	30%	80%
Substratos	Hematina, Fe-hematoporfirina, Acetato de Fe-hematoporfirina, hemoglobina, cyt P-450b, cyt P-420b, cyt P-420c	Hematina, Fe-hematoporfirina, Acetato de Fe-hematoporfirina, hemoglobina, cyt P-450b, cyt P-420b, cyt P-420c

**Tabla 3. Características de las isoformas de la HO.** \*Datos obtenidos usando como sustrato el grupo hemo. \*\* C/EBP: proteínas de unión al intensificador CCAAT, USF: factor de estimulación en el extremo, MRE: elemento de respuesta a metales, HSE: elemento de respuesta a choque térmico. Tomado y adaptado de Orozco-Ibarra y Pedraza-Chaverrí, 2010; Maines, 1988.

### **Localización**

La HO-1, se ha descrito como una proteína integral de membrana (Tenhunen et al, 1968; Tenhunen et al, 1969), localizada en el retículo endoplasmático liso (REL). Esta localización se derivó por la expresión constitutiva del cADN de HO-1 de rata en células de riñón de mono (COS-7) (Shibahara et al, 1985). Se detectó, en fracciones microsomales con membranas celulares, una alta actividad de HO-1 (Yoshinaga et al, 1982). Se reveló que su anclaje a las membranas celulares, se

debía a la presencia de un dominio carboxilo terminal hidrofóbico (Shibahara et al, 1985; Keyse y Tyrrell, 1989).

Sin embargo, trabajos de los últimos años, han detectado su redistribución en varias fracciones celulares, luego de la inducción por estrés (Kim et al, 2004; Lin et al, 2007; Sacca et al, 2007). En células endoteliales quiescentes de la microvasculatura cerebral de cerdos recién nacidos se observó, mediante inmunofluorescencia, que HO-1 se distribuía en la envoltura nuclear y en la zona perinuclear del citoplasma, pero no se observó tinción en el núcleo (Parfenova et al, 2001). Se reportó la localización nuclear de HO-1, en cultivos primarios de células astrogiales de rata, y se asoció su translocación con mecanismos involucrados en el desarrollo del cerebro y enfermedades neurodegenerativas, indicando que esta proteína podría modular los caminos de transducción de señales, y funcionar como un mecanismo importante para la regulación de factores de transcripción nucleares (Li Volti et al, 2004). Se detectó tinción nuclear positiva en carcinomas de próstata humanos, células de CaP tratados con hemina y tumores PC3HO-1 y se relacionó dicha localización con una progresión de la enfermedad (Sacca et al, 2006; Gueron et al, 2007). Estudios acerca de la localización subcelular de la enzima realizados en carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello y gliomas, detectaron una fuerte tinción nuclear y su incremento también se asoció con la progresión tumoral (Gandini et al, 2012; 2014)

En células endoteliales arteriales de pulmón de rata (PAEC), la sobre-expresión de HO-1 por ciertos inductores como la hemina o hipoxia, resultó en una alteración en su patrón de distribución celular. Se aisló membrana plasmática, citosol y caveolas y se observó que la expresión de HO-1 aumentó en la fracción de membrana plasmática resistente a detergentes que contenía caveolina-1. Además, se detectó actividad de BVR endógena en las caveolas, apoyando las evidencias que demuestran que ambas enzimas se encuentran en el mismo compartimiento celular (Kim et al, 2004).

Un trabajo publicado por Slebos y colaboradores (2006), destacan la acumulación de la proteína activa en la mitocondria de células epiteliales de pulmón, preservando la producción de ATP mitocondrial y previniendo la muerte celular en

respuesta a bajos niveles de estrés. Al mismo tiempo, Converso y colaboradores (2006), también observaron una localización mitocondrial de HO-1 en hígado de rata, proponiendo que HO-1, tendría un rol biológico importante en regular la tasa de proteínas hémicas mitocondriales y en la protección contra condiciones en las cuales está implicada la producción de oxidantes. En células de pulmón de fetos de rata (RFL-6), transfectadas con la secuencia completa del ADN de HO-1 y expuestas a hiperoxia se observó localización perinuclear seguida por migración hacia el núcleo. Este fenómeno no se había reportado previamente y se propuso que HO-1 podría servir como una chaperona o un mensajero nuclear. Sin embargo, no es claro si la proteína HO-1 per se, puede tener un rol protector en el núcleo (Suttner y Dennery, 1999). Hay quienes infieren que la localización nuclear de HO-1 se debe a una retro-alimentación negativa, inhibiendo la sobre-expresión de HO-1 (Noel y Tyrrell, 1997). Sin embargo, hasta la fecha, el conocimiento de la compartimentalización intracelular de HO es limitado y su función en dicho compartimento debe ser dilucidada ya que parece ser tejido dependiente.

### ***Mecanismos de Inducción de HO-1***

El análisis del promotor del gen *hmox-1* de ratón, permitió identificar un fragmento de 10 pb (T/CGCTGAGTCA), denominado *elemento de respuesta al estrés* (StRE). Este fragmento, está presente en múltiples copias, en dos regiones amplificadoras (E1 y E2, localizadas a -4 y -10 kb del sitio de iniciación de la transcripción) y se sugirió, que media la activación del promotor en respuesta a muchos de los inductores de HO-1. Otras secuencias consenso para la unión de factores de transcripción que se solapan con los StRE son, los sitios de unión de factores de transcripción diméricos AP-1, constituidos por miembros de la familia de Jun, Fos, ATF, CREB, Maf, que pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción con dominios de cierre de leucina. Un rol a destacar en la regulación del gen *hmox-1*, es el de los CNC-bZip. Estos factores incluyen a p45, a los factores eritroides nucleares Nrf1, Nrf2, Nrf3 y a Bach1/2 que se heterodimeriza

principalmente con las pequeñas proteínas Maf (MafF, MafG y MafK) (Astort, 2012).

El factor Nrf2, que contiene un dominio de activación transcripcional muy importante, participa en la inducción de genes antioxidantes y detoxificantes de fase II, como hmox-1, en respuesta a múltiples agentes, incluyendo hemo, metales pesados, arsenito, curcumina, 15-deoxi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J2 y varios reactivos electrofílicos (Uruno y Motohashi, 2011). En estado basal, Nrf2 está anclado al citoplasma por su interacción con la proteína Keap1, y es degradado por el proteosoma por un mecanismo que involucra su ubiquitinación mediada por Cul3. Keap1 posee dominios sensibles a agentes electrofílicos que provocan la liberación de Nrf2, su acumulación y desplazamiento al núcleo. Además, la fosforilación de Nrf2 produce su activación (Uruno y Motohashi, 2011).

Las proteínas Bach no poseen dominios de activación transcripcional, y por lo tanto, se postula que los heterodímeros Bach/Maf funcionarían como represores, bloqueando la unión de factores activadores como Nrf2 a sus sitios en los promotores. Se ha demostrado que el factor Bach1 reprime la inducción del gen de HO-1 mediante su unión a los sitios potenciadores. La unión de hemo a Bach1, provoca su exportación del núcleo dejando los sitios amplificadores libres para su ocupación por factores activadores, por ejemplo, Nrf2 (Sun et al, 2002).

Si bien el hemo puede funcionar como ligando e interactuar directamente con el ADN para activar al gen de HO-1, éste no es el mecanismo utilizado por la mayoría de los inductores. Las evidencias indican que, los inductores incrementan la expresión de HO-1 activando una o más cascadas de señalización que eventualmente convergen en activadores de la transcripción. Los segundos mensajeros AMPc y GMPc, que activan a la PKA y a la PKG respectivamente, participan en algunas de esas cascadas de señalización interviniendo en la transducción de las señales de diversas hormonas y estímulos extracelulares.

Dado que el NO activa la producción de GMPc, se sugirió que éste podría ser un activador del gen hmox-1, lo que fue demostrado en hepatocitos y en células endoteliales (Astort, 2012).

Las vías de las MAPKs participan de las respuestas celulares al estrés regulando la expresión génica, la proliferación celular y la apoptosis. Con relación a la inducción de HO-1, la utilización de las diferentes cascadas de señalización de MAPKs y sus factores de transcripción blanco depende del inductor, del tipo celular y de la especie. También se ha demostrado la participación de la vía de NFκB, un factor proinflamatorio y sensible al estado redox, en la inducción de HO-1 por compuestos polifenólicos como el resveratrol (Astort, 2012).

Un estímulo puede provocar la activación de más de una vía de inducción de HO-1. En este sentido, Chen y colaboradores (2005) demostraron que la inducción de HO-1 por estatinas depende de la acción conjunta de las vías GMPc/PKG y MAPKs ERK y p38 en macrófagos murinos.

El estrés oxidativo es considerado uno de los principales inductores de HO-1 y entre los mecanismos de transducción de señales, demostrados en diversos sistemas celulares, pueden mencionarse los que involucran la activación de las vías de MAPKs, PI3K/Akt, PKC y los factores de transcripción NFκB, AP-1, Nrf2, p53, HIF1, entre otros (Valko et al, 2002; Gloire et al, 2006; Astort, 2012).

### ***HO-1 y Cáncer***

Además de su rol citoprotector clásico en los últimos años se ha comenzado a obtener evidencia de la participación de la HO-1 en los procesos neoplásicos (Jozkowicz et al, 2007; Was et al, 2010). Ha sido estudiada en algunos tipos de cáncer que se mencionan a continuación aunque en casi todos los estudios se trabajó con un número bajo de muestras. Se ha reportado la expresión de HO-1 en gliomas (Hara et al, 1996; Deininger et al, 2000), en cáncer de próstata (Maines y Abrahamsson, 1996; Sacca et al, 2007), en carcinoma oral (Tsuji et al, 1999; Yanagawa et al, 2004), carcinoma colorrectal (Becker et al, 2007), en cáncer pancreático (Berberat et al, 2005), en carcinoma renal (Goodman et al, 1997), cáncer de pulmón (Boschetto et al, 2008), de vesícula biliar (Wang et al, 2010), melanoma (Torisu-Itakura et al, 2000) y en mielomas (Mayerhofer et al, 2004). En la mayoría de estos estudios se ha observado un incremento de HO-1 en los

tumores en relación a los tejidos no malignos. Los mecanismos a través de los cuales HO-1 estaría relacionada con el cáncer están lejos de ser totalmente dilucidados y distintos reportes muestran a la enzima tanto favoreciendo como inhibiendo la progresión tumoral, a veces en forma específica para cada clase de tumor (Jozkowicz et al, 2007; Was et al, 2010). Algunos de los trabajos mencionados demuestran una correlación de HO-1 con una disminución del riesgo de metástasis ganglionar (Yanagawa et al, 2004) y su asociación con un aumento de la supervivencia de los pacientes (Becker et al, 2007) mientras que otros describen una relación con la progresión tumoral (Deininger et al, 2000).

El tipo celular que expresa la enzima parece ser específico de cada cáncer. Por ejemplo, en algunas muestras de melanomas, de gliomas y en cáncer pulmonar se encuentra expresada en macrófagos y poco en células tumorales, en cambio en tumores de próstata se detecta en las propias células neoplásicas. Más importante aún, recientemente se ha reportado una inusual localización nuclear de HO-1 en células NIH3T3 acompañada de una activación de factores de transcripción de respuesta al stress oxidativo (Lin et al, 2007). Poco después se detectó expresión nuclear en cáncer de próstata y se observó que dicha localización se asocia con la progresión tumoral (Sacca et al, 2007). También se ha detectado una fuerte expresión nuclear de la enzima en carcinomas celulares escamosos de cabeza y cuello (Gandini et al, 2012) y en células malignas de carcinomas mamarios (resultados aun no publicados por nuestro laboratorio). La HO-1 se encuentra muy a menudo sobre-expresada en células que proliferan rápidamente tales como las epiteliales de una lesión de piel (Hanselmann et al, 2001). Sin embargo, la influencia que posee la enzima sobre la proliferación parece diferir de acuerdo al tipo celular. Por ejemplo, en cultivos de queratinocitos (Clark et al, 1997), de células endoteliales (Jozkowicz et al, 2003) y en líneas celulares de cáncer de páncreas (Berberat et al, 2005) la HO-1 promueve la proliferación. En tanto que en líneas celulares de carcinoma mamario (Hill et al, 2005 y observaciones no publicadas de nuestro laboratorio), de carcinoma prostático (Gueron et al, 2009) y en células de músculo liso vascular (Jeon et al, 2009) la enzima presenta propiedades antiproliferativas. Además de estar involucrada en los procesos de

proliferación celular, se ha descrito, generalmente en cultivos celulares, que modula la apoptosis, la angiogénesis, la diferenciación y la migración celular (Jozkowicz et al, 2007; Gueron et al, 2009).

### ***HO-1 y CCR***

Particularmente en la fisiología intestinal normal y en el cáncer de colon, se ha demostrado que la HO-1 se incrementa en respuesta a stress oxidativo (Takagi et al, 2008). Sin embargo, poco ha sido estudiado sobre las características de expresión de esta enzima en muestras de carcinomas colorrectales humanos y hay muy escasa información acerca de los mecanismos a través de los cuales influencia el desarrollo de esta clase de tumores. Varios grupos de investigación han estudiado la expresión de la enzima en patologías intestinales humanas tales como colitis ulcerosa (Takagi et al, 2008) y enfermedad intestinal inflamatoria (Naito et al, 2004). Sorprendentemente, hay sólo dos trabajos en la literatura que estudian la expresión de HO-1 y lo hacen en un grupo pequeño de pacientes de carcinoma colorrectal. Uno de ellos demuestra que la expresión de HO-1 se asocia con una mayor sobrevida de los pacientes (Becker et al, 2007); mientras que el otro muestra que la inhibición de la enzima favorece la sensibilidad a la quimioterapia (Yin et al, 2014). Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio en 98 biopsias de carcinoma colorrectal invasivo, mostraron una expresión mayor de la HO-1 en epitelio tumoral comparado con el epitelio colorrectal no maligno adyacente. Todos estos antecedentes sugieren enfáticamente la necesidad de estudiar la expresión de HO-1 en un número más grande de biopsias humanas de carcinomas colorrectales y sus metástasis evaluando la posibilidad de que sea un factor importante en el proceso de carcinogénesis y/o progresión de la enfermedad. Además, y dada la discrepancia en cuanto a los efectos reportados de HO-1 sobre los procesos de proliferación y apoptosis, es importante realizar estudios mecanísticos adicionales que apunten a develar el rol de esta enzima en el cáncer colorrectal.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis General**

Alteraciones en el funcionamiento normal del HO-1 favorece la supervivencia, invasión y migración celulares en carcinomas colorrectales estimulando el desarrollo o progresión tumoral y su sobreexpresión podría ejercer efectos antineoplásicos. La corroboración de esta hipótesis sugeriría la posibilidad de que HO-1 sea un factor importante en el proceso de carcinogénesis y un blanco de estrategias terapéuticas.

### **Objetivo General**

Existe evidencia que relaciona a la hemoxigenasa-1 (HO-1) con el cáncer, la mayoría de la cual fue obtenida en sistemas de cultivos celulares y en menor proporción en modelos animales. Sin embargo son abundantes los ejemplos de resultados y descubrimientos realizados en el área de la investigación oncológica utilizando estos sistemas experimentales que posteriormente no han podido aplicarse al cáncer humano. Teniendo en cuenta que los estudios de expresión de esta proteína en tumores humanos (particularmente en el cáncer colorrectal) son sumamente escasos, el objetivo general es estudiar la importancia de esta proteína en el desarrollo y/o progresión tumoral humana evaluando la factibilidad de utilizarla como blanco de estrategias terapéuticas y/o como factor pronóstico.

### **Objetivos Específicos**

Enmarcados dentro del objetivo general, los objetivos específicos de este trabajo de tesis son:

En primer lugar, estudiar la expresión de HO-1 en biopsias quirúrgicas obtenidas de pacientes con diagnóstico de carcinoma de colon con metástasis presentes al

momento del diagnóstico o como recurrencia de la enfermedad y evaluar si existe alguna correlación entre los niveles de expresión y parámetros clínicos e histopatológicos. Esto aportará evidencia acerca de la importancia de esta molécula en el carcinoma colorrectal humano.

En segundo lugar, investigar el rol de HO-1 en la carcinogénesis y progresión del carcinoma colorrectal utilizando como modelos animales, ratas y ratones. Al tratarse de mamíferos, una gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre, poseen un tiempo generacional corto, lo que los convierte en un buen modelo para el estudio de las enfermedades humanas sin perder la capacidad de descubrir las complejas interconexiones entre los sistemas. Los modelos animales en medicina experimental son útiles fundamentalmente para tres propósitos: (i) identificar la base molecular de la enfermedad, (ii) estudiar la fisiopatología de la enfermedad y, (iii) ensayar nuevas terapias para la misma (Benavides y Guenet, 2000).

En tercer lugar, se pretende comenzar a estudiar los mecanismos a través de los cuales la precitada proteína influye en la carcinogénesis y progresión tumoral utilizando líneas celulares humanas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos: cloruro de hemina equina (Sigma Aldrich, USA), dicloruro de estaño (IV) protoporfirina IX (SnPP; Frontier Scientific Europe, Ltd., Carnforth, Lancashire, United Kingdom), 4-3-4-iodofenil-2-4-nitrofenil-2H-5-tetrazolio-1,3-benzeno disulfonato (Cell Proliferation Reagent WST-1 Roche), cloruro de sodio (Cicarelli), cloruro de potasio (Biopack), sodio fosfato dibásico anhidro (Biopack), potasio fosfato monobásico (Mallinckrodt), Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare), acrilamida 99,9 % reactivo de pureza para electroforesis (BIO-RAD), glicina reactivo de pureza para electroforesis (BIO-RAD), N,N'-metileno-bis-acrilamida reactivo de pureza para electroforesis (BIO-RAD), N,N,N', N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED) (BIO-RAD), persulfato de amonio (BIO-RAD), Tritón X-100 para electroforesis (SIGMA), Tween 20 para electroforesis (SIGMA), Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD), hidróxido de sodio calidad analítica (Anedra), LB Agar Ampicilina, MBI Fermentas, extracto de levadura (Britania), glicerol (SIGMA), ribonucleasa A de páncreas bovino (SIGMA), solución de yoduro de propidio (Roche), alcohol etílico medicinal (Porta), alcohol etílico absoluto (Dorwil), xilol (Dorwil), metanol (Cicarelli), peróxido de hidrógeno 30 % (v/v) (Cicarelli), portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Scientific), cubreobjetos Patho Glass, albumina sérica bovina Amersham (GE Healthcare) y kit de revelado de inmunohistoquímica de Vector (Vectastain).

## ***Tratamientos con hemina y estaño (IV) protoporfirina IX (SnPP)***

### ***Preparación de las soluciones stock:***

*Hemina:* 36 mg de cloruro de hemina se disolvieron en 0,4 ml de NaOH 0,5 N y se agregaron 0,5 ml de tris-HCl 1 M pH 8, se filtró utilizando filtros de 0,2  $\mu$ m y se conservó alicuotado a -70 °C y al resguardo de la luz. Inmediatamente antes de su uso, se diluyó en PBS 1:100 (Muppala et al, 2000).

*SnPP:* Se disolvieron 5 mg de dicloruro de SnPP en 1,47 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). La solución se filtró utilizando filtros de 0,2  $\mu$ m y se conservó alicuotada a -70 °C y al resguardo de la luz. Se diluyó en medio de cultivo antes de su uso. La concentración utilizada de DMSO por pocillo, fue de 0,1 %.

### ***Anticuerpos***

Los anticuerpos utilizados fueron: policlonal primario de conejo anti-HO-1 (SPA-896, Stressgen Bioreagents, Canadá), policlonal de ratón anti-p27/Kip1 (BD Transducción Laboratorios™), policlonal de ratón anti-p21WAF1/CIP1 (BD Pharmingen™), monoclonal de conejo anti-ciclina D1 (SP4, Thermo Scientific Inc.), policlonal de conejo anti-p53 (sc-6243, Santa Cruz de Biotecnología), policlonal de conejo anti-Bax (sc-493, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), policlonal de conejo anti-PKC  $\beta$ I (sc-209, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), policlonal de conejo anti-PKC  $\beta$ II (sc-210, Santa Cruz Biotechnology), policlonal de cabra anti-actina C11 (Sc-1615, Santa Cruz Biotecnología), Phospho-Akt (Ser473) polyclonal de conejo, monoclonal de ratón PARP1 (MAB3290, EMD Millipore). Los anticuerpos secundarios biotinilados, fueron adquiridos de Vector Laboratories. Los anticuerpos secundarios-HRP conjugados (Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody) fueron obtenidos de Amersham (GE Healthcare). Se emplearon los anticuerpos secundarios fluorocromo conjugado anti-conejo Alexa 566 (Molecular Probes, Invitrogen), Alexa-Fluor488 (Molecular Probes, Leiden/The

Netherlands), fluorocromo conjugado anti-ratón Alexa-Fluor488 (Molecular Probes, Leiden/The Netherlands) y el anti-cabra IgFITC (SC-2777, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Las células marcadas fueron montadas con DAPI-containing VectaShield Mounting Medium (Vector Laboratories, CA/USA) y DRAQ5™ fluorescent DNA dye (5 mM).

### **Líneas celulares**

Las líneas celulares de CCR humano, HCT116, HCT116 p53 -/-, HCT116pcDNA3, HCT116pcDNA3-HO-1, HT29 y LoVo se mantuvieron a 37 °C en un incubador con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en medio DMEM, , McCoy's 5a y F-12K (Sigma) suplementado con 10 % (v/v) de FBS (Gibco), L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (Gibco, 100 U/ml) y estreptomina (Gibco, 100 g/ml).

### **Biopsias de neoplasias humanas**

Se utilizaron 98 muestras de biopsias de carcinoma colorrectal humano, aportadas por Hospital Italiano Regional del Sur (Bahía Blanca, Argentina), cuyos comités de ética y de investigación, aprobaron los protocolos correspondientes. Dichas biopsias fueron utilizadas para analizar la expresión de HO-1 y su asociación con parámetros clínico-patológicos. Las biopsias se obtuvieron antes de iniciar el tratamiento. Si el paciente, post al tratamiento, se había operado de las metástasis, se volvió a obtener material de las metástasis El tratamiento depende de los estadios de la enfermedad y de las comorbilidades. En general, se utiliza QT (folfox o folfiri) + Biológico (bevacizumab o cetuximab). Estas combinaciones también varían, en si es 1, 2 o 3 líneas. Además, la elección del biológico depende del estado de K-ras, y del objetivo terapéutico a lograr. Las muestras correspondieron a tumores primarios, obtenidos por la resección quirúrgica de pacientes con CCR invasivos. El estadio del CCR fue determinado utilizando el Séptimo Sistema de Clasificación de la Unión Internacional contra el Cáncer, Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM). Los datos fueron obtenidos en el momento del

diagnóstico, la respuesta al tratamiento, evolución y seguimiento, sexo, localización del tumor primario, fecha de la cirugía, la fecha de la muerte o el último contacto, fecha de la recaída, el sitio de la recaída, la obstrucción y/o perforación intestinal durante el diagnóstico y el antígeno carcinoembrionario prequirúrgico (CEA). De la biopsia del tumor primario, se obtuvo el tamaño del tumor, la invasión en la pared intestinal, metástasis en los ganglios linfáticos regionales, invasión vascular o perineural, grado de diferenciación, estado mutacional de K-ras y la expresión del receptor para EGFR-1. Se cortaron una serie de secciones de 5 micras y se transfirieron a portaobjetos de vidrio histológicos para ser teñidas con hematoxilina y eosina, el diagnóstico inicial fue confirmado por un médico patólogo. Se evaluó la calidad de los cortes, prestándose especial atención tanto a la adecuada fijación del material como a la presencia de zonas con lesión representativa.

### **Análisis de supervivencia de HO-1 y p53 en pacientes con cancer colorectal**

Se efectuó un análisis de supervivencia univariado en un grupo de 290 pacientes con cáncer colorrectal en función de la expresión del gen HO-1 y el estatus mutacional de p53; para lo cual se descargó el perfil de expresión de HO-1 y el perfil de mutaciones del gen p53 del proyecto TCGA COADREAD, generados por RNAseq y Exomeseq. The Cancer Genome Atlas (TCGA), es una fuente de datos de acceso público que se inició como una colaboración entre el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) y el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI). Tiene como objetivo generar mapas exhaustivos, multi-dimensionales de los cambios genómicos clave en los principales tipos y subtipos de cáncer. Es bien conocida la asociación entre, la agresividad de los tumores colorrectales y el fenómeno de la hiper-mutación, en el que la tasa de mutación genética es anormalmente alta debido a que los mecanismos de reparación del ADN normales se interrumpen. Los perfiles de expresión/mutación y la información clínico-patológica asociada, fue descargada desde Cancer Browser (<https://genome-cancer.soe.ucsc.edu/>) y cBioPorta (<http://www.cbioportal.org/>) respectivamente. El

análisis e integración de dichos datos fue realizado en R/Bioconductor. Brevemente, los pacientes fueron divididos en cuatro grupos en función del estatus del gen p53 (mutado o wild type) y de la expresión de HO-1 (alta o baja expresión en función de la mediana). Se empleó el paquete survival de R para el análisis de Kaplan-Meier y el cálculo del log-Rank p-value. Este análisis fue llevado a cabo por el Dr Martín Abba.

## **Modelos animales**

### ***Inducción química (DMH) de CCR en ratas Wistar***

Para el modelo de cáncer colorrectal se utilizaron Ratas Wistar macho (N = 31), de 8 semanas de edad y peso promedio de 350 gramos. 28 de ellas fueron inyectadas, por vía intramuscular, con 1,2-dimetilhidrazina (DMH) 20 mg/kg, una vez por semana, durante 8 semanas. En los diferentes estadios progresivos a lo largo del desarrollo del tumor, los animales fueron anestesiados y sacrificados para recoger las muestras necesarias (pólipos, adenocarcinomas y carcinomas de células en anillo de sello). Se recogió el tejido normal de animales, que pertenecían a la misma colonia, que no habían sido tratados con DMH (n = 3), con el fin de realizar estudios comparativos con mucosa normal. Las muestras fueron fijadas en formol al 10 % para inmunohistoquímica.

### ***Implante subcutáneo de células humanas de CCR en modelos murinos inmunocomprometidos***

Se realizó un modelo murino, con ratones N:NIH (S)-Fox1nu (*nude*) machos de 8 semanas de edad y de un peso medio de 25 gramos. Se les implantaron en el flanco izquierdo y/o derecho, utilizando una jeringa tipo insulina con aguja 30GX ½, de manera subcutánea,  $3 \times 10^6$  células HCT116pcDNA3, HCT116pcDNA3-HO-1, HCT116 y HCT116 p53 -/-, según correspondiera, obtenidas por tripsinización de cultivos con una confluencia del 80-90 %, en 100 µl de medio DMEM libre de

suero. Se utilizaron 6 animales para cada tratamiento. 6 individuos fueron seleccionados al azar y fueron inyectados con las células HCT116pcDNA3 y 6 con HCT116pcDNA3-HO-1. Luego de 16 días, los tumores fueron palpables y se tomó la medida longitudinal y transversal de los mismos cada dos días, así como también se tomó el peso de los ratones. Al día 40, se procedió al sacrificio por dislocación cervical, según recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación. Para analizar el volumen de los tumores disecados, en ambos grupos, se empleó la fórmula  $\pi/6 \times a \times b \times c$ , donde  $a$ ,  $b$  y  $c$  son las 3 dimensiones del tumor (se asume una forma elipsoidal; Geran et al, 1972) y para hacer un seguimiento de la evolución de los tumores *in vivo*, se utilizó la fórmula  $\pi/6 \times a \times b^2$  siendo  $a$  la medida de mayor dimensión y  $b$  la de menor dimensión.

Se inyectó de igual manera a 12 ratones: en el flanco izquierdo la línea celular HCT116 y en el flanco derecho la línea celular HCT116 p53 -/-. A partir del día 15, cuando los tumores fueron palpables, se dividió a los individuos aleatoriamente en 2 grupos de 6, quienes recibieron 9 aplicaciones intratumorales de hemina y vehículo (0,2 mg/kg, 100  $\mu$ m) durante 3 semanas. Al día 28, se procedió al sacrificio como se detalló anteriormente.

Los tumores disecados, se midieron, se pesaron, se fotografiaron y se fijaron con formol al 10 % en PBS 1X, durante 24 h para su posterior procesamiento por técnicas histológicas.

## **Técnicas Histológicas**

### ***Procesamiento de órganos y tumores para histología***

Los tumores de los ratones fueron disecados y colocados en moldes individuales, enjuagados bajo agua corriente durante 15 min, escurridos y colocados en concentraciones crecientes de alcohol (70, 80, 96 y 100 %) durante 1 h cada una, posteriormente se colocaron en aclarante histológico por 2 h, se secaron y pasaron a recipientes con parafina a 56 °C. Transcurridas 3 h se procedió a armar los tacos y rotularlos. Se realizaron cortes de 0,5  $\mu$ m de espesor con un micrótopo

Leica RM 2245 y se colocaron en portaobjetos. Posteriormente se sumergieron en aclarante histológico y se colocaron en estufa a 60 °C por 1 h para fundir la parafina. Luego los tejidos fueron rehidratados por medio de inmersión en una secuencia de soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100, 96, 80 y 70 %, 4 min en c/u). Luego se colocaron en agua destilada por 5 min, se tiñeron con hematoxilina (Tabla 4) por 15 seg y se sumergieron en alcohol 70 % 2 min. Posteriormente se tiñeron con eosina (Tabla 4) por 30 seg y se deshidrataron en soluciones alcohólicas de concentración creciente (70, 96, 100 %, 15 seg en c/u). Finalmente se colocaron en aclarante histológico y se realizó el montaje con bálsamo de Canadá (Biopack). Los preparados fueron observados con un microscopio Olympus CX31 equipado con una cámara Lumera Infinity Microscopy USB 2.0.

<b>Hematoxilina según Harrys</b>		<b>Eosina</b>	
<b>Hematoxilina</b>	<b>5 g</b>	<b>Eosina</b>	<b>1 g</b>
<b>Alcohol 100</b>	<b>50 ml</b>	<b>Agua destilada</b>	<b>100 ml</b>
<b>Ácido acético</b>	<b>30 ml</b>	<b>Alcohol 96</b>	<b>hasta 1000 ml</b>
<b>Alumbre de K</b>	<b>100 g</b>	<b>Floxilina B</b>	<b>10 ml</b>
		<b>(1 g/100 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>)</b>	
<b>Oxido rojo de Hg</b>	<b>2,5 g</b>	<b>Ácido acético</b>	<b>4 ml</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>hasta 1000 ml</b>		

**Tabla 4. Composición de las soluciones de Hematoxilina según Harris y Eosina.**

### **Evaluación del Índice mitótico (IM) y del Índice nuclear (IN)**

Con el fin de determinar el grado de malignidad de los tumores, se evaluó la morfología histológica a partir de dos índices, el índice mitótico (IM) y el índice nuclear (IN). La evaluación del índice mitótico y del índice nuclear se llevó a cabo utilizando preparados teñidos con hematoxilina y eosina. Para evaluarlos, se

contaron las figuras mitóticas típicas y atípicas y se observó el pleomorfismo de los núcleos en 10 campos al azar bajo un aumento de 40X/0.65/0.17 con un microscopio LABOMED CxL. El índice mitótico fue calculado como la mediana de todas las figuras mitóticas observadas. Para evaluar el índice nuclear, se tuvo en cuenta el pleomorfismo nuclear, la variabilidad de la forma y el tamaño de los núcleos neoplásicos entre ellos mismos y en comparación con los normales (variabilidad escasa = 1, variabilidad moderada = 2, variabilidad marcada = 3). Con el fin de que estas cuantificaciones fueran analizadas por un investigador con experiencia en las mismas y que desconociera el tratamiento al que fue sometido cada preparado, este análisis fue realizado por el médico patólogo Julián Arévalo.

### **Inmunohistoquímica (IHQ)**

Se realizó IHQ, para analizar la expresión de HO-1, en las biopsias humanas y en biopsias de tumores de los distintos modelos animales. Inicialmente, se colocaron los preparados en estufa a 55 °C por 30 min para fundir la parafina. Posteriormente, los tejidos fueron desparafinados con aclarante histológico 100 % a 60 °C por 1 h y a temperatura ambiente por 10 min; luego, rehidratados, sumergiéndolos sucesivamente en etanol 100 % por 10 min, etanol 96 % por 10 min, etanol 70 % por 10 min, todo a temperatura ambiente, y un baño final, de peróxido de hidrógeno 3 % en alcohol al 96 %, con el fin de eliminar la actividad peroxidasa endógena. Los preparados, fueron lavados 2 veces con PBS 1X, por 5 min, y bloqueados con una solución de BSA 2 % en PBS 1X, durante 30 min, en una cámara húmeda. Las secciones fueron incubadas toda la noche, a 4 °C, con un anticuerpo de conejo primario anti-HO-1 (SPA-896, Streessen; 1:100) diluido en BSA 2 % disuelta en PBS 1X. El mismo proceso, en todos los casos, fue aplicado sobre un preparado control, en ausencia del anticuerpo primario. Posteriormente, fueron lavados 3 veces, con PBS 1X durante 5 min, e incubados con una dilución 1:400 del anticuerpo secundario (anti conejo o anti cabra biotinilado según corresponda) preparado en BSA 2 % disuelta en PBS 1X a

temperatura ambiente por 30 min en cámara húmeda. Al mismo tiempo, se preparó el reactivo ABC Vectastain (Vector Laboratories) en PBS 1X, dilución 1:50, dejándolo reaccionar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min antes de su utilización. Los preparados, fueron lavados 3 veces con PBS 1X durante 5 min, fueron incubados con el reactivo AB a temperatura ambiente durante 30 min en cámara húmeda en oscuridad y se realizaron 3 lavados finales con PBS 1X por 5 min. Se preparó el reactivo de diaminobencidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma), y posteriormente, se agregaron bajo el microscopio óptico, 200 µl del mismo sobre el tejido, controlando el desarrollo de la reacción. Se realizó, como coloración de contraste, una tinción con hematoxilina de Meyer (Zymed) por 1 min durante 30 seg. Finalmente, los tejidos fueron deshidratados efectuando inmersiones consecutivas de los mismos en baños de etanol 70 %, 96 % y 100 % respectivamente, durante 4 min y fueron aclarados con aclarante histológico 100 %. Se montaron con Cálamo de Canadá (Biopack), y se dejaron secar hasta el día siguiente, para ser analizadas. Se observaron con microscopio de campo claro Olympus (CX31).

### **Evaluación de la intensidad de la tinción y análisis estadístico**

Los preparados humanos inmunomarcados fueron semicuantificados, en base a la cantidad de células tumorales marcadas y la intensidad de tinción, mediante el uso de un *score* inmunorreactivo de semicuantificación (el IRS es el producto de la intensidad de tinción por el porcentaje de las células teñidas). Se utilizó el siguiente criterio para la intensidad de la tinción: 0 (negativo); 1 (tinción débil); 2 (tinción moderada) y 3 (tinción fuerte). Se graduó entre 0 y 3 el porcentaje de células teñidas: (0: menos del 10% de células inmunomarcadas; 1: del 11 al 50%; 2: del 51 al 80% y 3: más de 81%). Se determinó para cada muestra el IRS promedio de 10 campos elegidos al azar (400x). Secciones con un IRS > 0 fueron consideradas positivas. El IRS para HO-1 fue dividido en tres grupos: negativo (SI=0), baja expresión (SI: 1-3) y alta expresión (SI: 4-9). Para estimar el valor discriminativo del IRS, para la expresión de HO-1 en CCR, se trazaron curvas

ROC (Característica Operativa del Receptor), y las áreas correspondientes bajo las curvas (AUC) se compararon mediante varios posibles valores de corte, como ya se ha descrito (Gandini et al, 2014). Para el estudio de la tinción nuclear de HO-1, en muestras humanas y en el modelo animal, se evaluó el porcentaje total de núcleos positivos para HO-1. Las muestras que contenían más de un 10 % de células teñidas se consideraron positivas. Se utilizó el software GraphPad Prism 5 para la recolección, procesamiento y análisis estadístico de todos los datos.

## **Transfecciones**

### ***Transfección transitoria y estable***

Se utilizaron dos plásmidos de expresión de la proteína HO-1. Uno de ellos, amablemente donado por la Dra. Phyllis A. Dennery (Children's Hospital of Philadelphia and Department of Pediatrics, University of Pennsylvania, Philadelphia USA), expresa una proteína de fusión de la forma nativa de la proteína con EGFP (enhanced green fluorescent protein, pEGFP-HO-1). El otro, pcDNA3-HO-1 fue gentilmente donado por la Dra. Elba Vázquez (Universidad de Buenos Aires). Además, se empleó un pcDNA3-p53, generosamente donado por la Dra. Adriana De Siervi (Universidad de Buenos Aires), para introducir p53 en la línea celular HCT116 p53  $-/-$ . La selección de las células de la línea estable se realizó mediante la incorporación del antibiótico G418 o Gentamicina (40 mg/ml).

### ***Transfección de células con Lipoafectamina***

Se sembraron  $2,0 \times 10^5$  células sobre cubreobjetos estériles en placas de 2,5 cm de diámetro, en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 % y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 %. Luego de 24 h, las células fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de HO-1, utilizando Lipoafectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

A las 48 h, se verificó la expresión de HO-1, mediante microscopia de fluorescencia y *western blot*.

### ***Transformación de bacterias competentes***

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

### ***Aislamiento de ADN plasmídico***

Se realizó un cultivo en medio LB líquido con ampicilina, tomando las bacterias transformadas con el plásmido de interés e incubándolo toda la noche a 37 °C con agitación orbital. Luego, se centrifugó a 6000 g durante 15 min a 4 °C. Se utilizó el kit de maxiprep de Sigma para la purificación del ADN plasmídico, siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN se cuantificó por medición de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro JunWay UV-V.

## **Ensayos de viabilidad celular**

### ***Análisis de viabilidad celular mediante conteo de células en cámara de Neubauer***

Para repicar las células de CRC, HCT116, HCT116 p53  $-/-$  y HT29, se retiró el medio de cultivo, se lavó con 5 ml de PBS 1X y se agregó 500  $\mu$ l de tripsina. Las células se resuspendieron por el agregado de 2 ml de medio estéril. Se extrajo una alícuota para contar el número de células en cámara de Neubauer. Las células se sembraron con una densidad de 1.500 células por pocillo en placas de 96 pocillos con 100  $\mu$ l de medio de cultivo completo. 48 h más tarde fueron tratadas con un inductor o un inhibidor de la actividad de HO-1 (hemina y dicloruro de estaño (IV) protoporfirina (IX) (SnPP), respectivamente) a diferentes dosis y diferentes tiempos. Se extrajo una alícuota (10  $\mu$ l) y se contó el número de células en cámara de Neubauer por triplicado. Cada tratamiento se realizó por triplicado para cada línea celular. Se graficó el número de células utilizando el software GraphPad Prism 5 y se comparó la cantidad de células obtenidas luego del tratamiento respecto al control.

Alternativamente, las líneas celulares HCT116 y HCT116 p53  $-/-$  fueron sembradas en 96 pocillos placas y 72 h más tarde, las células HCT116 p53  $-/-$ , fueron transfectadas como anteriormente se describió. 24 h después de la transfección, fueron tratadas con hemina (100  $\mu$ M) y el vehículo; 96 h después, fueron contadas manualmente.

### ***Análisis de viabilidad celular mediante xCELLigence™ System/RT-CESTM System***

Adicionalmente, se midió la viabilidad celular, en las líneas celulares HCT116 y LoVo, utilizando el xCELLigence™ System (ROCHE), también conocido como RT-CES™ system, que contiene una serie de analizador en tiempo real (RTCA). Es un

sistema de ensayo, basado en el etiquetado de células mediante la integración de micro electrodos y la biología celular. El sistema, se basa en un biosensor micro-electrónico, incorporado en cada una de las 6 placas para el plato de 96 pocillos E-plate™. El sensor mide la impedancia eléctrica de la población celular en el pocillo. Aquellas que tienen contacto con el sensor cambian este valor entre los microelectrodos. La medición de este dato proporciona información cuantitativa en tiempo de lectura sobre el estado de las células, incluyendo el número celular, la viabilidad y la morfología. Los datos fueron analizados mediante el software RTCA Software 1.2.1.1002.

### **Análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

El análisis del ciclo celular de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células HCT116 y HCT116 p53 -/- fue realizado por FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter Analysis). Las células se sincronizaron por privación de suero fetal bovino durante 24 h. Luego se trataron con hemina y vehículo (100  $\mu\text{m}$ ) durante 24 h. Posteriormente, fueron lavadas con 1 ml de PBS 1X y centrifugadas a 3.000 rpm por 3 min 2 veces. Se fijaron resuspendiéndolas mediante el agregado gota a gota de 1 ml de etanol 70 % (v/v) a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  y conservadas hasta el momento de la tinción. Para realizar dicha tinción, las células fueron centrifugadas a 3.000 rpm por 4 min, lavadas 2 veces con PBS frío y resuspendidas en 0,5 ml de PBS 1X conteniendo 10  $\mu\text{g/ml}$  de ioduro de propidio (IP, Roche) y 250  $\mu\text{g/ml}$  RNasa A. El IP, se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del DNA y produce un aducto altamente fluorescente, que puede ser excitado a 488 nm con un ancho de emisión centrado en alrededor de 600 nm. Dado que el IP también puede unirse al ARN, es necesario tratar a las células con RNasa para una óptima resolución del DNA. Para el análisis, se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur Becton Dickinson usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y de 585 nm de emisión. Cien mil células fueron analizadas por cada muestra. Se empleó un programa para histogramas de deconvolución de la frecuencia del contenido de DNA (ModFit LT cell cycle analysis software) y se graficó el porcentaje de células en las distintas

fases del ciclo celular. Además, los datos fueron analizados con el software Cell Quest (Becton Dickinson).

## **Ensayos de apoptosis**

### ***Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo***

Las células apoptóticas fueron analizadas utilizando el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (AV, 556420) siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen).

Las células HCT116, se trataron con hemina o su vehículo (100  $\mu\text{m}$ ) durante 24 h. Luego de los tratamientos correspondientes, fueron tripsinizadas, colectadas y centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 min. Luego, fueron lavadas dos veces con PBS 1X y resuspendidas en buffer binding anteriormente mencionado a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de las células resuspendidas y se les agregó 5  $\mu\text{l}$  de Anexina V-FITC y 10  $\mu\text{l}$  de IP, luego, se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) por 15 min. Posteriormente, se agregó 400  $\mu\text{l}$  de buffer binding a cada tubo. Por último, 100.000 células fueron analizadas por cada muestra en citómetro de flujo FACSCalibur Becton Dickinson durante el transcurso de la siguiente hora. Se realizaron los siguientes controles para establecer las compensaciones y los cuadrantes: 1) células sin teñir, 2) células teñidas solamente con Anexina V-FITC (sin IP) y 3) células teñidas solamente con IP (sin Anexina V-FITC). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado. Los datos fueron analizados con el software Cell Quest (Becton Dickinson). Se graficó y cuantificó el % de células con marcación AV y IP positiva (apoptosis tardía), AV positiva y IP negativa (apoptosis temprana), AV negativa y IP positiva (necrosis) y AV y IP negativa (células viables).

### ***Análisis de apoptosis mediante la medición de la actividad de caspasa-3***

Se utilizó un kit de fluorescencia específico, caspasa-3 fluorescencia de Cayman. Se trató a las células con HCT116 con FAS y CM, CSE (humo de cigarrillo) y se sobre-expresó la HO-1 farmacológicamente y genéticamente. Se realizaron lisados de células y se hizo una medición de proteínas y una curva de calibrado. Luego, en una placa multiwell-96 por triplicado se depositó 20 µg de lisado proteico, inhibidores y sustratos del kit siguiendo instrucciones del fabricante. Finalmente, se midió la actividad de caspasa-3 mediante el software Gen5 1.11 (Bio Tek).

### **Ensayo de Toxicidad**

Se utilizó el kit desarrollado por CytoTox-Glo™ (Promega) para medir la toxicidad de la droga hemina. Consiste en un ensayo de citotoxicidad luminiscente que mide el número relativo de células muertas en las poblaciones de células. La cantidad de luminiscencia se correlaciona directamente con el porcentaje de células sometidas a estrés citotóxico. Se siguió el protocolo del fabricante.

### **Migración celular**

Se realizó el ensayo de *wound healing* (Petit & Thiery, 2000). Este método, imita la migración celular durante la cicatrización in vivo. Se sembraron las células HCT116 y HCT116 p53 -/-, HCT116pcDNA3 y HCT116pcDNA3-HO-1 en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se cultivaron por 24 h hasta que formaron una monocapa. Luego, se hizo una herida con un tip de una micropipeta de 200 µl dejando al descubierto una sección de la monocapa celular. Se retiró el medio de cultivo y se añadió nuevo medio conteniendo hemina o vehículo (100 µm) cuando correspondía. Las células fueron fotografiadas con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000S con cámara digital Sony Coolpix cada 4 h durante 24 h.

Utilizando el programa ImageJ, se midió el área descubierta para cada tratamiento a los distintos tiempos comparando los distintos tratamientos. Se realizaron gráficos representando el porcentaje de herida descubierta en los distintos intervalos de tiempo, tomando un valor de 100 % de herida descubierta a 0 h. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SD, con 4 réplicas cada uno.

### **Invasión celular**

Se procedió a medir el poder invasivo de las células HCT116pcDNA3, HCT116pcDNA3-HO-1, y de las líneas HCT 116 y HCT 116p53 -/- luego de que la actividad de la HO-1 fuera modulada farmacológicamente.

El ensayo de invasión consiste en colocar insertos de membrana de policarbonato (12  $\mu$ m de tamaño de poro) en los pocillos de una placa de cultivo celular. Estos insertos, delimitan una cámara superior y una inferior. La superficie superior de los mismos se recubre con una capa uniforme de Matrigel®. Las células invasivas son capaces de degradar las proteínas de la matriz del Matrigel® y atravesar los poros de la membrana de policarbonato. Finalmente, las células que lograron atravesar la membrana, son teñidas y cuantificadas. Se colocaron 200  $\mu$ l de Matrigel (Becton Dickinson, dilución 1/10 en DMEM) por inserto de policarbonato y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Se sembraron células (20000 células/well en 0,5 ml de medio DMEM) en las cámaras superiores de los insertos de policarbonato. Se agregó 500  $\mu$ l de medio de cultivo DMEM a las cámaras inferiores de los pocillos. Luego de 16 h de incubación a 37 °C, se retiraron los insertos, se lavaron suavemente con 1 ml de PBS 1X, se fijaron en metanol 100 % (v/v) por 10 minutos (500  $\mu$ l/pocillo) y se tiñeron con cristal violeta 0,1 % (p/v) (Sigma) por 5 min. Luego, se lavaron los pocillos para remover el exceso del colorante, y las células que habían quedado en la parte superior de los insertos se removieron con un hisopo. Las células que habían atravesado los insertos hacia la cara inferior de los mismos fueron contadas en 4 campos distintos por microscopía

óptica. Se utilizó la prueba Student con  $p < 0,05$  como criterio para la significancia estadística.

## **Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE) y western blot**

### ***Preparación de lisados celulares***

Las células fueron sembradas en placas y tratadas con hemina o vehículo (100  $\mu\text{m}$ ) durante 4, 12, 18 y 24 h cuando correspondía. Luego, se les retiró el medio, se lavaron con PBS 1X y se les adicionó 75-150  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (2 % TRIS 1 M, 1 % Tritón-X 100, 0,5 M EDTA 0.5 M, 2 % NaCl 1 M) al cual se le agregó previamente 1  $\mu\text{l}$  de cocktail de inhibidores de proteasas, se levantaron las células con espátula y se las colocó en tubos eppendorf. La mezcla se dejó reposar durante 30 min en hielo.

### ***Medición de la concentración de proteínas***

Para la determinación de la concentración proteica se confeccionó una curva de calibrado constituida por cantidades crecientes de un estándar de BSA 1 mg/ml en un volumen final de 1 ml de reactivo de Bradford (RB) (BioRad). Se leyeron las absorbancias de los estándares a 595 nm. Paralelamente, se prepararon y trataron las muestras incógnitas de igual manera por duplicado.

### ***Preparación de las muestras***

Se realizaron los cálculos necesarios para llevar el volumen del lisado a la concentración de proteínas deseada con buffer de lisis y buffer muestra 4X (Tris 1 M 2,4 ml pH 6,8, SDS 0,8 g, glicerol 4 ml, 0,01 g azul de bromofenol, 1 ml BME, H<sub>2</sub>O destilada 2,8 ml). Finalmente, se calentó la mezcla por 5 min a 90 °C. Los lisados se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

## Electroforesis

Para la separación de proteínas por peso molecular, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 5 %, 12 % o 15 % según la proteína de interés. Para ello, se prepararon geles de *stacking* y de separación en las proporciones detalladas en los cuadros que se muestran a continuación. Se sembraron en una calle 7 µl de marcador de peso molecular (See Blue Plus, Invitrogen) y en las restantes 50 µg de proteínas, según los casos. Se realizó la separación en buffer de electroforesis, a 0,04 A para proteínas, migrando sobre el gel de *stacking* y a 0,06 A cuando penetran al gel de separación, hasta terminar la corrida.

Buffer electroforesis 1X
Tris Base 3 g
Glicina 14,4 g
SDS 10 % 10 ml
H <sub>2</sub> O Milli Q hasta completar 1L

Tabla 5. Composición del Buffer de electroforesis 1X.

Gel <i>stacking</i> 5 % (10 ml)	Gel separación 12 % (25 ml)	Gel separación 15 % (25 ml)
H <sub>2</sub> O 6,8 ml	H <sub>2</sub> O 8,2 ml	H <sub>2</sub> O 5,7 ml
Tris 1 M pH 6,8 1,25 ml	Tris 1,5M pH 8,8 6,3 ml	Tris 1,5M pH 8,8 6,3 ml
Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 1,7 ml	Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 10 ml	Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 12,5 ml
SDS 10 % 0,1 ml	SDS 10 % 0,25 ml	SDS 10 % 0,25 ml
TEMED 0,01 ml	TEMED 0,01 ml	TEMED 0,01 ml
APS 10 % 0,1 ml	APS 10 % 0,25 ml	APS 10 % 0,25 µl

Tabla 6. Composición del gel de *stacking* y de separación utilizados durante la electroforesis.

### ***Transferencia a membrana de PVDF***

Una vez concluida la separación electroforética, una de las caras del gel fue apoyada sobre una membrana de PDVF (Millipore), previamente activada con metanol por 1 min, ambos fueron colocados entre papeles de filtro previamente humedecidos en buffer de transferencia (ver tabla a continuación), y a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción, fue sumergida en la cámara electroforética con buffer de transferencia 1X con la membrana de PVDF del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 0,3 A durante 1,30 o 2 h dependiendo de la proteína de interés. Las membranas, fueron lavadas con PBS 1X, secadas y guardadas a 4 °C hasta su utilización.

<b>Buffer transferencia 1X</b>
<b>Tris Base 3,03 g</b>
<b>Glicina 14,4 g</b>
<b>Metanol 200 ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O Milli Q hasta completar 1L</b>

**Tabla 7. Composición del Buffer de transferencia 1X.**

### ***Inmunodetección de proteínas***

Las membranas, fueron activadas en metanol por 1 min y colocadas en PBS 1X, luego fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % en PBS 1X en agitación continua durante 30 min. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS 1X y se procedió a incubarlas durante toda la noche en cámara fría con una dilución adecuada de anticuerpo primario preparada en una solución de BSA 0,4 % en PBS 1X. Luego, se realizaron 3 lavados con Tween-20 0,01 % en PBS 1X e inmediatamente se incubó la membrana con una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante específico preparado en leche descremada al 5 % disuelta en PBS 1X a temperatura ambiente durante 1 h en agitación. Finalmente, se realizaron 3 lavados por 5 min con Tween-20 0,01 %

en PBS 1X, y se procedió a revelar las membranas. Se empleó para ello, el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (GE Healthcare) procediendo a efectuar la reacción según las especificaciones indicadas por el proveedor. Para su uso posterior, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS 1X, secadas y guardadas a 4 °C.

## **Inmunofluorescencia**

Las células HCT116 y HCT116 p53 -/- se sembraron en cubreobjetos de vidrio estériles. Las últimas fueron transfectadas con plásmidos pcDNA3-p53 y pcDNA3. 48 h más tarde fueron tratados con hemina y vehículo (100 µM) y luego se fijaron con 4 % paraformaldehído durante 10 min y se permeabilizaron con 0,1 % Triton X-100 (Sigma), seguido de una incubación con una solución de bloqueo (1 % BSA en PBS 1X) y se incubó toda la noche con el anticuerpo primario Anti-HO-1 (SPA-896 Stressgen, dilución: 1:100) y anti-p53 (sc-6243, Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:100) en cámara húmeda a 4 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X y se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo Alexa 566 (Molecular Probes, Invitrogen) por 1 h a temperatura ambiente. Se incubó por 10 min con DAPI (1:10000) en PBS 1X finalizando con el montado de los cubreobjetos sobre portaobjetos para su posterior visualización en microscopio de fluorescencia. Las IF se visualizaron utilizando un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) equipado con una cámara AxioCamMRm.

El recuento de células fue en 10 campos aleatorios (400X) se realizó con el fin de estudiar la proporción de células que contenían expresión de HO-1 y p53.

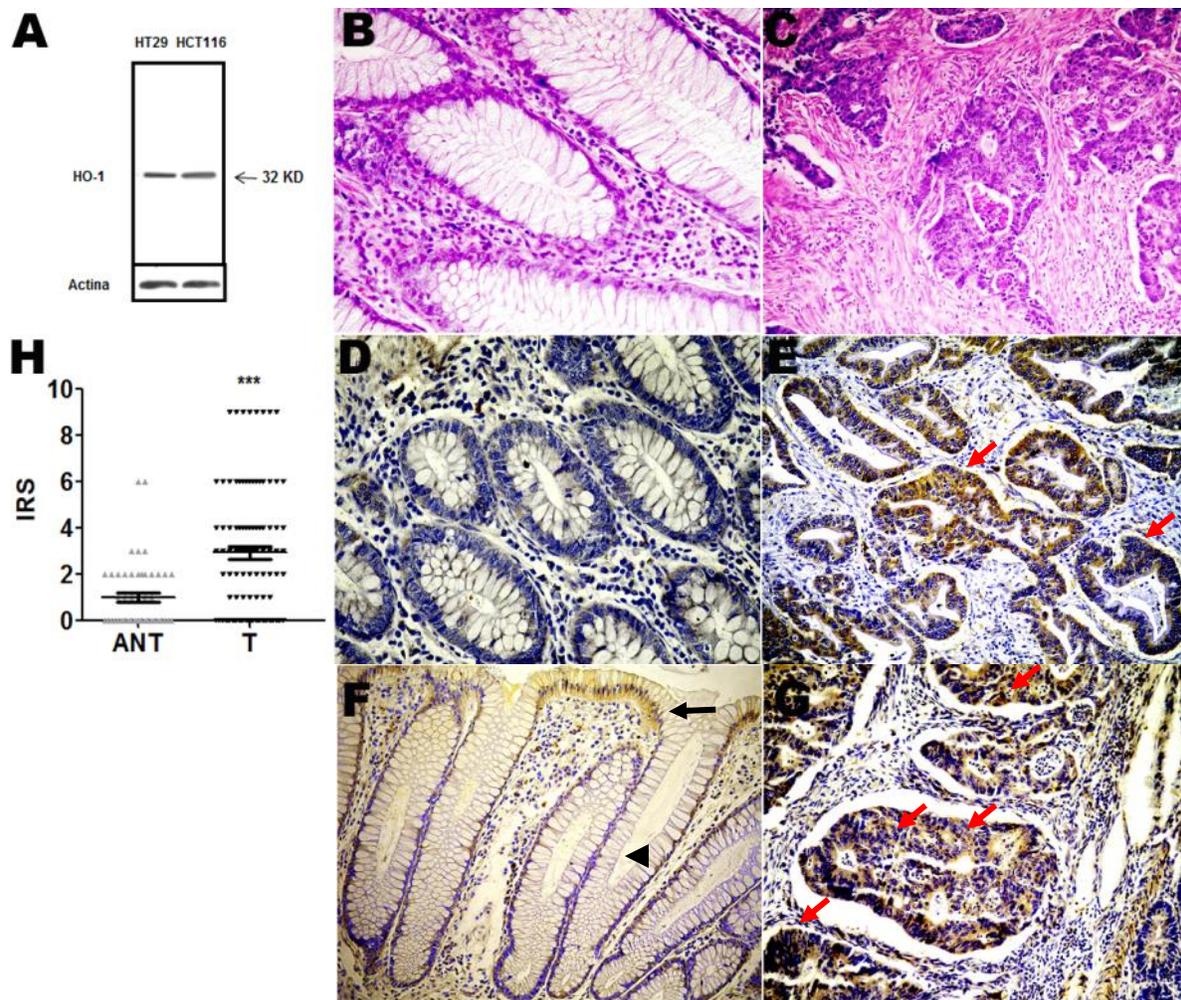
### ***Análisis estadístico***

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 de viabilidad celular, migración celular, y cambios en el volumen tumoral en el tiempo se realizó un ANOVA doble con posterior test de Bonferroni para la comparación de los grupos. Para los ensayos con modelos animales en los que se midió peso y volumen tumoral y el número de metástasis se utilizó el test no paramétrico de Mann Whitney. En biopsias humanas, se utilizaron los test de Mann Whitney y Chi-cuadrado. Además, para evaluar las diferencias en las curvas de sobrevida global de las pacientes en relación a la expresión de HO-1, se utilizó el test Log-rank (Mantel-Cox). El análisis multivariado se basó en el modelo de riesgo proporcional (Cox). Los valores  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

## RESULTADOS

### Validación del anticuerpo para HO-1 por inmunohistoquímica y análisis de la expresión de HO-1 en biopsias de CCR humanos.

Se comprobó la inmunoespecificidad del anticuerpo para HO-1 en CCR humano por *western blot* con lisados proteicos de líneas celulares de CCR humanos HT29 y HCT116 (Figura 12A). El anticuerpo reconoce exclusivamente una banda que representa a una proteína con una movilidad correspondiente al peso molecular de HO-1 (32 kDa). Posteriormente, se realizó tinción por inmunohistoquímica en 98 biopsias de CCR invasivo resecadas quirúrgicamente. La tinción con hematoxilina y eosina para cada muestra fue realizada para estudiar caracteres histopatológicos con el fin de confirmar el diagnóstico (Figura 12B y C). Treinta y dos de las muestras contenían tejidos histológicamente normales (epitelios no malignos) adyacentes al tumor. Luego, se procedió con la inmunohistoquímica para HO-1 tal como se describe en Materiales y Métodos. Dentro del epitelio no maligno se observó inmunorreactividad para la HO-1 en las células apicales de la cripta (Figura 12F, flecha negra); las células basales no mostraron expresión de HO-1 (Figura 12F, cabeza de flecha negra). Los tejidos tumorales mostraron mayores tasas de expresión (69,4%, 68/98; Figura 12E y G, flecha roja) que las áreas no malignas adyacentes al tumor (12,5%, 4/32;  $p = 0,04$ ; Figura 12D y F y Tabla 8). Se observaron diferencias entre tumor (T) y los tejidos no malignos adyacentes al tumor (ANT) en el análisis de los niveles de expresión de HO-1 (mediana IRS: 3 vs mediana IRS: 1, respectivamente;  $p = 0,0001$ ; Figura 12H).



**Figura 12. Detección específica de HO-1 en biopsias colorectales humanas.** Análisis por *western blot* (A) de lisados de las líneas celulares HT29 y HCT116 probados con anti HO-1 (SPA-896). Tinción con hematoxilina y eosina de tejido histológicamente normal adyacente al tumor 40X (B) y tejido tumoral 10X (C). Expresión de HO-1 en tejidos no malignos adyacentes al tumor 40X y 10X (D y F) y en sus respectivos tejidos tumorales 10X (E y G). Flecha negra: Inmunoreactividad de HO-1 observada en las células apicales de las criptas dentro del epitelio no maligno. Cabeza de flecha negra: células de la base carentes de coloración para HO-1. Flechas rojas: Alta expresión de HO-1 en tejidos tumorales. H. Dot plot mostrando los niveles (IRS) de HO-1 en tejidos tumorales (T) y en tejidos no malignos adyacentes al tumor (ANT). Análisis inmunohistoquímico revela diferencias en los niveles de expresión de HO-1 entre el tejido no tumoral adyacente al tumor (ANT) y tejido tumoral (T) (\*\* $p = 0,0001$ ; prueba Mann Whitney).

Grupos	Casos n	HO-1 (-), n (%)	HO-1 (+), n (%)	p
ANT	32	28 (87,5)	4 (12,5)	0,04
CCR	98	30 (30,7)	68 (69,3)	

Carcinoma Colorrectal. Prueba  $\chi^2$ .

**Tabla 8. Frecuencias de la expresión de HO-1 en muestras de carcinoma colorrectal (CCR) y sus tejidos adyacentes no malignos (ANT).**

**HO-1 se asocia con mayor tiempo de supervivencia global de los pacientes con CCR invasivo.**

Se estudió la correlación entre la expresión de HO-1 y varios parámetros clínicopatológicos importantes para el pronóstico de CCR como sexo, localización del tumor, grado de diferenciación (GD), índice mitótico (IM), índice nuclear (IN), compromiso de los nódulos linfáticos, presencia de metástasis, estado mutacional de K-ras, niveles de CEA pre-quirúrgicos y expresión de EGFR (Tabla 9). Este análisis reveló una correlación significativa entre la expresión positiva HO-1 y el estado de K-ras ( $p = 0.04$ ) y niveles normales de CEA ( $p = 0,04$ ; prueba de  $\chi^2$ ).

La regresión logística es una herramienta explicativa y predictiva que analiza la relación entre una variable binaria dependiente (0 o 1) y las variables independientes, que pueden ser de cualquier tipo, categóricas o continuas (Wenz, 2012). Mediante este análisis, se reforzó la correlación previamente encontrada entre el estado de K-ras y niveles de CEA con la expresión de HO-1. La probabilidad que HO-1 esté presente cuando K-ras está en su estado salvaje es 2,76 veces mayor que cuando K-ras está mutado, esta chance está explicada por el *odds ratio*: 2,763 (Cerdeira et al, 2013; Figura 13A). Y la probabilidad que la expresión de HO-1 sea positiva cuando los niveles del CEA son normales es 3,03 veces mayor que cuando sus niveles son altos (Figura 13B). Las tablas C y D de la Figura 12 muestran la bondad de ajuste respecto a la eficiencia del modelo para predecir los casos en base a los datos observados (63,77% para K-ras/HO-1 y 61,33% para los niveles de CEA/HO-1), siendo mejor la predicción de los casos en

los que K-ras está *wild type* (85,37%) y cuando los niveles de CEA son normales (72,22%).

	Casos n	HO-1(+) n (%)	HO-1 (-) n (%)	p
<b>Sexo</b>				
Femenino	36	20(55,5)	16(44,4)	0,4
Masculino	39	25(64,1)	14(35,9)	
No disponible	8			
<b>Localización</b>				
Colón	68	45(66,2)	23(33,8)	0,9
Recto	15	10(66,7)	5(33,3)	
No disponible	-			
<b>GD</b>				
I	20	17(85)	3(15)	0,058
II	53	30(56,6)	23(43,4)	
III	5	4(80)	1(20)	
No disponible	5			
<b>IM</b>				
I	20	16(80)	4(20)	0,1
II	32	18(56,25)	14(43,75)	
III	2	1(50)	1(50)	
No disponible	29			
<b>IN</b>				
I	8	5(62,5)	3(37,5)	0,2
II	41	23(56,1)	18(43,9)	
III	4	4(100)	0(0)	
No disponible	30			
<b>Ganglios</b>				
No	17	12(70,6)	5(29,4)	0,4
Si	53	28(52,83)	25(40,17)	
No disponible	12			
<b>K-ras</b>				
<i>Wild type</i>	55	36(65,45)	19(34,54)	0,04
Mutado	16	6(37,5)	10(62,5)	
No disponible	12			
<b>CEA</b>				
normal	20	15(75)	5(25)	0,04
Alto	26	12(46,2)	14(53,8)	
No disponible	40			
<b>EGFR1</b>				
1+	17	8(47)	9(53)	0,1
2+	13	10(77)	3(23)	

3+	5	4(80)	1(20)
No disponible	48		

Tabla 9. Resumen de características de y expresión de HO-1 y su correlación con características clínicas-patológicas.

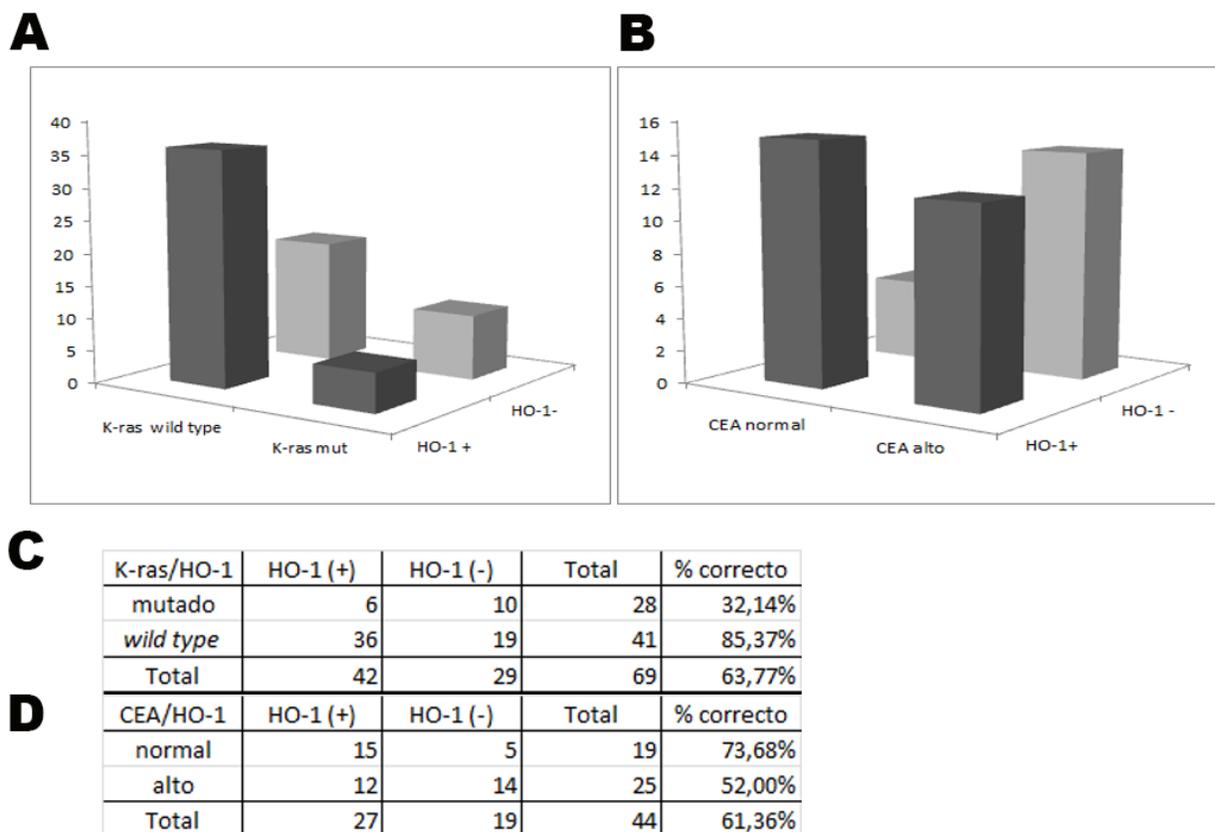
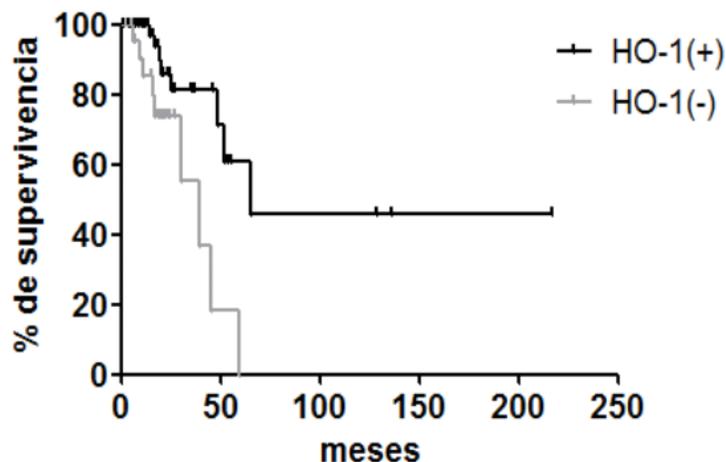


Figura 13. La regresión logística forma parte del conjunto de métodos estadísticos que valora la contribución de diferentes factores en la ocurrencia de un evento simple. **A.** Gráfico representando la correlación positiva entre estado mutacional de K-ras y expresión de HO-1. Cuando K-ras se encuentra *wild type*, la expresión de HO-1 tiende a ser positiva en tejidos de las biopsias; mientras que la expresión de la enzima tiende a ser negativa cuando K-ras está mutado. **B.** Esquema donde se evidencia que cuando los niveles de CEA son normales, la expresión de HO-1 es predominantemente positiva. **C** y **D.** Porcentajes representativos de la eficiencia del modelo para representar los datos observados.

El siguiente paso consistió en examinar si HO-1 podría ser considerado un factor pronóstico en el CCR invasivo. Para este propósito se analizó si la expresión de la proteína HO-1 se asociaba con el tiempo de supervivencia global (SG) del paciente. Con el fin de evitar los problemas de selección de puntos de corte múltiples, se realizó un análisis con curva ROC para determinar un punto de corte razonable de HO-1 en las muestras de CCR. El mejor punto de corte para HO-1 en la supervivencia general (SG) fue un *score* > 1 (Sensibilidad: 61,11 y especificidad: 69,09; AUC = 0,703; intervalo de confianza del 95% = 0,585 hasta 0,804;  $p = 0,0018$ ). En resumen, los pacientes con una puntuación de corte > 1 se consideraron HO-1 positivos y aquellos con una puntuación < 1 se consideraron como HO-1 negativa.

Curiosamente, se encontró una asociación entre la positividad de HO-1 en el tumor y una supervivencia más larga de los pacientes ( $p = 0,0058$ ; Log Rank Test; Figura 14). Los pacientes cuyos tumores presentaban expresión positiva de HO-1 tuvieron una mediana de supervivencia de 65 meses; mientras que los pacientes que presentan expresión negativa de la proteína tuvieron una mediana en el tiempo de supervivencia de 39 meses.



**Figura 14. Curva de supervivencia de Kaplan Meier.** Pacientes con expresión de HO-1 positiva en sus tumores presentan un mayor tiempo de supervivencia global (SG) que los pacientes con expresión negativa de HO-1 (N = 78;  $p = 0,0058$ , Log Rank Test).

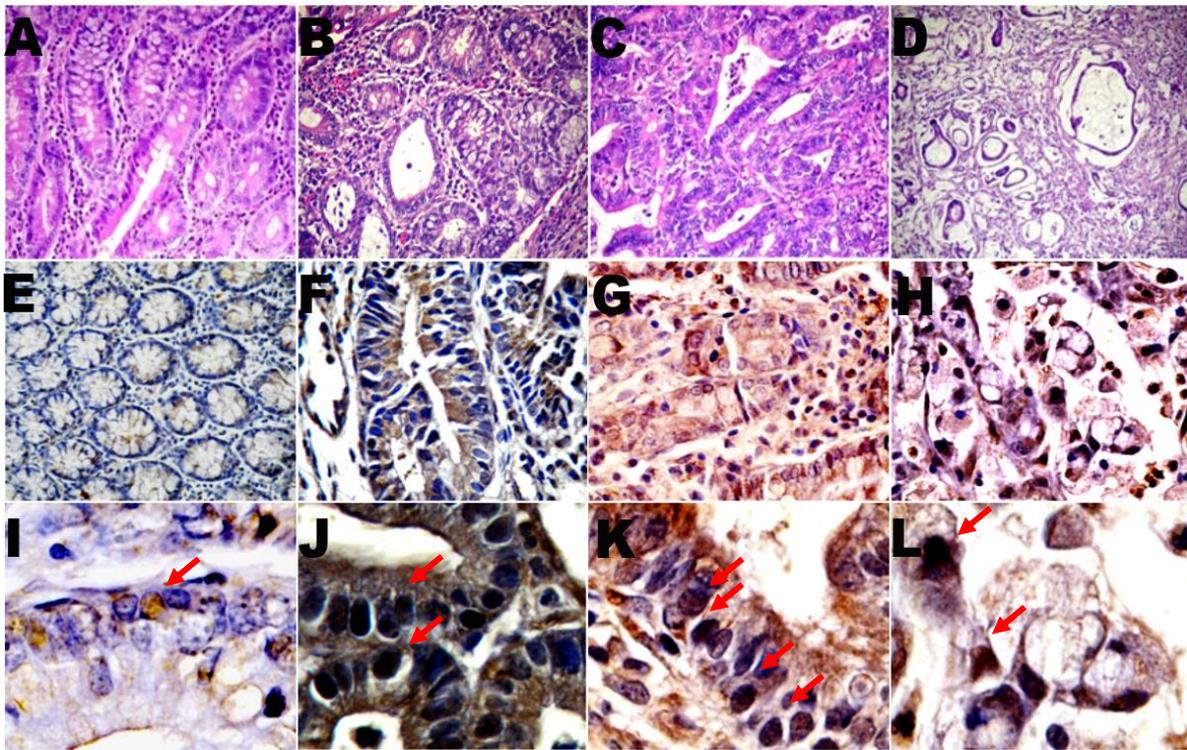
## **En estadios avanzados del modelo animal de inducción química de CCR, aumenta la expresión de HO-1 y transloca a núcleo**

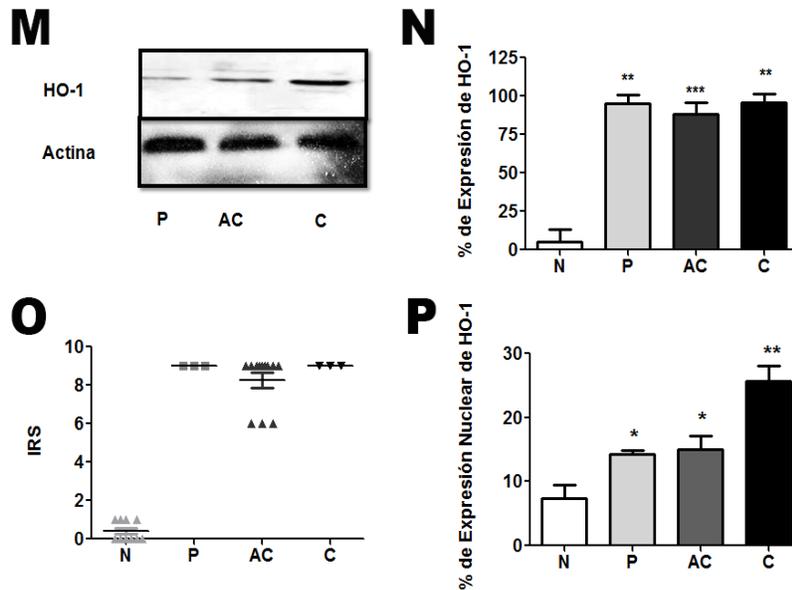
Con el fin de profundizar el significado de HO-1 en el CCR, en principio, se evaluó la expresión de la enzima durante la progresión de un modelo de CCR inducido químicamente. Para este propósito, se aislaron tejidos epiteliales histológicamente normales (Figura 15A, E, I), pólipos (Figura 15B, F, J), tejidos de adenocarcinoma (Figura 15C, G, K) y tejidos de carcinoma de células en anillo de sello (Figura 15D, H, L) que se obtuvieron en diferentes momentos de la progresión de la enfermedad. Carcinomas de células en anillo de sello se han caracterizado como entidades muy malignas (Nissan et al, 1999; Bradford, 1976). Se detectó tinción positiva en 4/10 (40%) del tejido histológicamente normal, 3/3 (100%) de los pólipos, 12/12 (100%) de muestras de adenocarcinoma y 3/3 (100%) de las muestras de carcinoma de células en anillo de sello.

La expresión de las proteínas mostró patrón de tinción inmunológica y localización subcelular similar a los observados en las muestras humanas. La expresión de HO-1 se incrementó con la progresión tumoral (Figura 15M). Pólipos ( $p = 0,009$ ), adenocarcinoma ( $p < 0,0001$ ) y el carcinoma de células en anillo de sello ( $p = 0,009$ ) mostraron mayores tasas de expresión de la proteína HO-1 que el epitelio histológicamente normal (Figura 15N).

HO-1 ha sido descrita, como una enzima microsomal; sin embargo, un número creciente de trabajos (Sacca et al, 2007; Gueron et al, 2009; Gandini et al, 2012; 2014; Birrane et al, 2013; Yin et al, 2014) informaron acerca de la localización nuclear de la enzima en diferentes tejidos y tipos de células y han demostrado una asociación de localización nuclear con la progresión de la enfermedad (Gandini et al, 2012); coincidentemente con estos datos, el análisis de los niveles de expresión de HO-1 también fueron mayores en los estadios más avanzados (mediana IRS normal = 1 vs mediana IRS pólipo = 9, mediana IRS adenocarcinoma = 9 vs mediana IRS mediana IRS normal = 9;  $p = 0,0001$ , ANOVA, Figura 15O).

Por lo tanto, estudiamos la localización subcelular de HO-1 en los tejidos de este modelo animal de CCR. Se observó tinción nuclear en 3/4 tejidos normales (mediana  $\pm$  SD del porcentaje de núcleos marcados de todas las muestras positivas:  $7,3 \pm 2$ ), 3/3 de los pólipos ( $15 \pm 3$ ;  $p = 0,035$ ), 8/12 de las muestras de adenocarcinoma ( $15 \pm 5$ ;  $p = 0,019$ ) y 3/3 carcinoma en anillo de sello ( $25,6 \pm 3$ ;  $p = 0,002$ ), evidenciando que las tasas de localización nuclear de HO-1 aumentan con la progresión de la enfermedad ( $p < 0,0001$ , test ANOVA; Figura 15P).



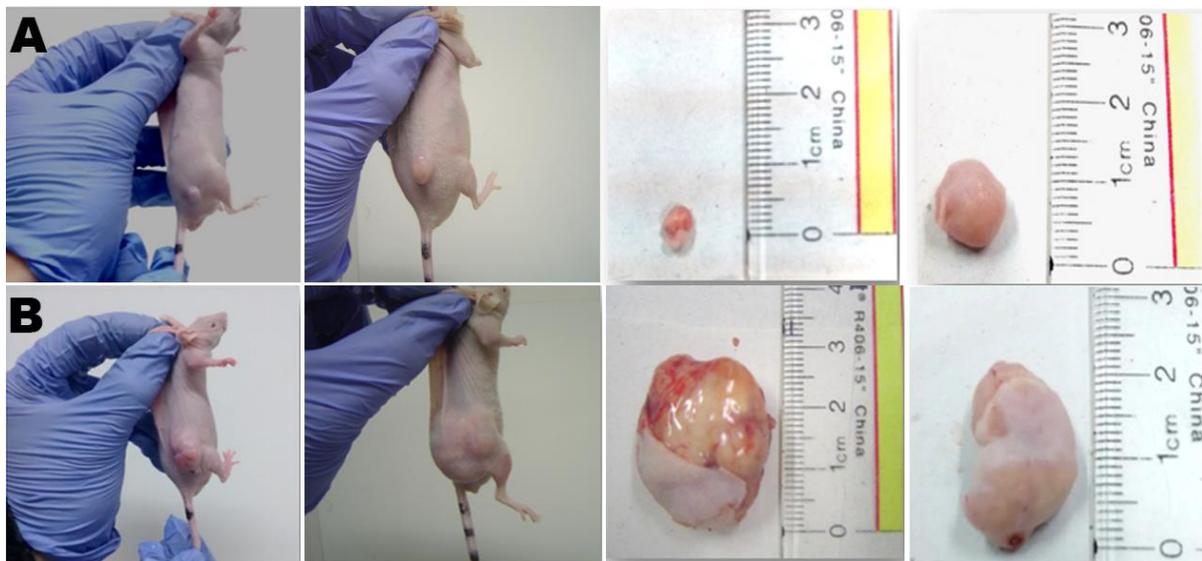


**Figura 15. La expresión de HO-1 y la localización nuclear aumenta con la progresión tumoral en un modelo de CCR animal de inducción química.** Tinción con hematoxilina y eosina 10X (A - D) e inmunohistoquímica para HO-1 40X y 1000X (E - L) en tejidos no malignos (A, E, I), pólipos (B, F, J), adenocarcinomas (C, G y K), tejidos de carcinoma de células en anillo (D, H y L) obtenidos del modelo animal. Flechas rojas: muestran tinción de HO-1 citoplasmática y nuclear (I - L). **M.** *Western blot* mostrando la expresión de HO-1 en tejidos de pólipos (P), adenocarcinoma (AC) y carcinoma de células en anillo (C). Se normalizó con actina. **N.** Análisis de la expresión de HO-1 en epitelio no maligno (N), pólipos (P), adenocarcinoma (AC) y carcinoma de células en anillo (C); \*\* $p = 0,009$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ , test de Man Whitney. **O.** El dot plot muestra los niveles (IRS) de HO-1 en epitelio no maligno (N), pólipos (P), adenocarcinoma (AC) y carcinoma de células en anillo (C); \*\*\* $p = 0,001$ , ANOVA. **P.** Gráfico que detalla las frecuencias observadas para la expresión nuclear de HO-1 en epitelio no tumoral (N), pólipos (P), adenocarcinoma (AC) y carcinoma de células en anillo (C); \*\* $p = 0,035$ ; \* $p = 0.019$  y \*\* $p = 0,002$  comparado con el tejido no maligno adyacente al tumor (N), test de Bonferroni.

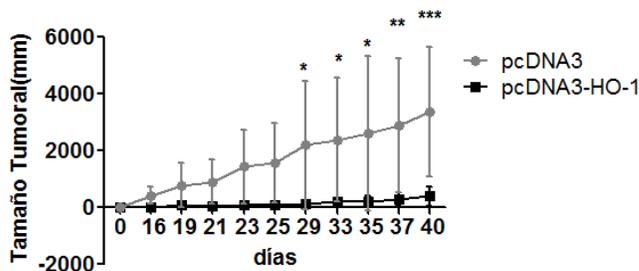
**La sobre-expresión genética de HO-1 reduce la carga tumoral y se reafirma la localización nuclear en un modelo murino de CCR.**

Como se describió en el apartado anterior, se pudo detectar una inusual localización nuclear de esta proteína en biopsias humanas obtenidas quirúrgicamente y en un modelo animal. Al momento de realizar esta observación no existían muchos reportes de esta localización para HO-1. Además, esta localización resultaba extraña para una proteína microsomal cuya principal función conocida hasta el momento, era la enzimática. Por esta razón, se decidió estudiar la expresión de HO-1 en otro modelo animal de carcinoma colorrectal.

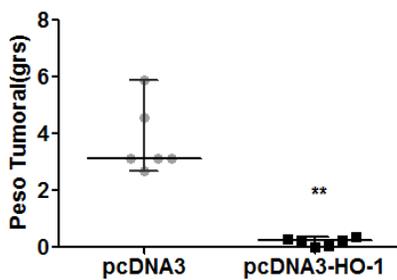
Con el objetivo de confirmar la influencia que tiene la HO-1 en el desarrollo del carcinoma colorrectal, se evaluó el efecto de la sobre-expresión genética de HO-1 sobre la carga tumoral. Para este propósito se transfectó la línea de carcinoma colorrectal HCT116 con los plásmidos pcDNA3 y pcDNA3-HO-1. Una vez logradas las líneas estables, se inyectaron de manera subcutánea las líneas celulares HCT116pcDNA3 y HCT116pcDNA3-HO-1 en ratones *nude* de 8 semanas de vida. A los 15 días de inyectadas las células, momento en el cual los tumores fueron palpables, se comenzó a hacer un seguimiento cada 2 días de las medidas de los tumores y peso de los individuos hasta el día 40, momento en el cual se procedió a la resección de los mismos (Figura 16A y B). Se observó que los tumores de los individuos inyectados con las células que sobre-expresaban HO-1 crecían significativamente más lento que los controles a partir del día 29 ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , test Two Way ANOVA; Figura 16C). Luego de haberlos removidos al día 40, los tumores fueron medidos y pesados. La carga tumoral disminuyó significativamente en los animales inyectados con la línea celular HCT116pcDNA3-HO-1 (Figura 16A) comparado con los ratones inyectados con la línea células HCT116pcDNA3 (Figura 16B), mediana  $\pm$  SD = 0.25g  $\pm$  0,14 vs mediana = 3,13 g  $\pm$  1,22;  $p = 0,002$ ; Figura 16D y mediana  $\pm$  SD = 211.1 mm<sup>3</sup>  $\pm$  231,1 vs mediana = 4483 mm<sup>3</sup>  $\pm$  1303;  $p = 0.002$ ; test de Mann Whitney; Figura 16E.



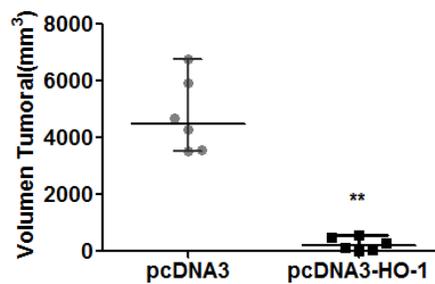
**C**



**D**



**E**



**Figura 16.** Efecto de la sobre-expresión genética de HO-1 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de implante subcutáneo de células HCT116pcDNA3 y HCT116pcDNA3-HO-1 en ratones *nude*. Los animales (n=6) fueron inyectados de manera subcutánea con 3.000.000 de células HCT116pcDNA3 y HCT116pcDNA3-HO-1 tal como se describió en materiales y métodos. Fotografías *in vivo* y *ex vivo* de dos tumores representativos HCT116pcDNA3-HO-1 (**A**) y dos tumores HCT116 pcDNA3 (**B**). **C.** Crecimiento de los tumores a lo largo del tiempo (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ; Two Way ANOVA). **D y E.** Evaluación del efecto de la sobre-expresión genética de HO-1

sobre la carga tumoral (peso y volumen). En los gráficos se representa la mediana del volumen **(D)** y tamaño tumoral **(E)** de cada grupo. Se realizó el test de Mann Whitney, \*\*  $p = 0,002$ .

Se analizó la histología de los tumores. Es sabido que el número de mitosis aumenta en relación directa con la velocidad de crecimiento y el tamaño tumoral (Astudillo, 2004; Ortega et al, 2005; Gil González et al, 2009), por ello se determinó el índice mitótico (IM) y el índice nuclear (IN) luego de una tinción con hematoxilina y eosina, para determinar si había diferencia entre los tumores que sobre-expresaban HO-1 y sus controles. Los tumores HCT116pcDNA3-HO-1 (Figura 17B y D) presentaron menor cantidad de figuras mitóticas (flecha negra) que sus controles (Figura 17A y C) (mediana  $\pm$  SD =  $1,7 \pm 0,97$  vs mediana =  $8,25 \pm 1,56$  \*\* $p = 0,002$ ; test de Mann Whitney; Figura 17E). Incluso los tumores HCT116pcDNA3 presentaron mitosis particulares tripolares, que al observarlas bajo MO, parecen emular el logo de *Mercedes Benz* (flecha roja) y multipolares, llamadas *explosivas* (flecha amarilla), donde los cromosomas pierden orientación y polaridad y son supernumerarios. Este tipo de figuras mitóticas indica que la mitosis no avanza normalmente y se consideran signo definitivo de malignidad. No se detectaron diferencias significativas en el pleomorfismo nuclear, todos los tumores presentaron un IN = 3 (Figura 17F).

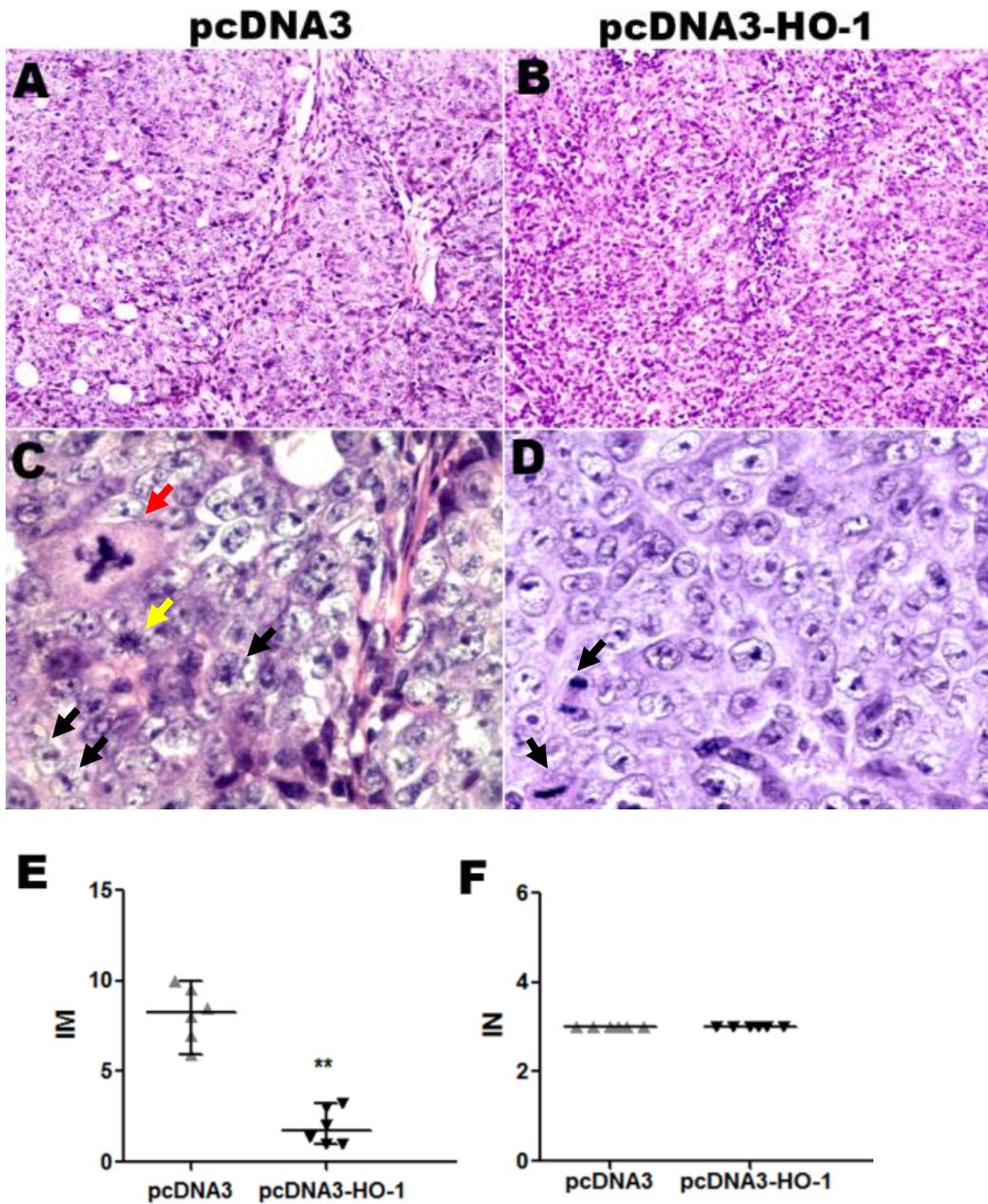
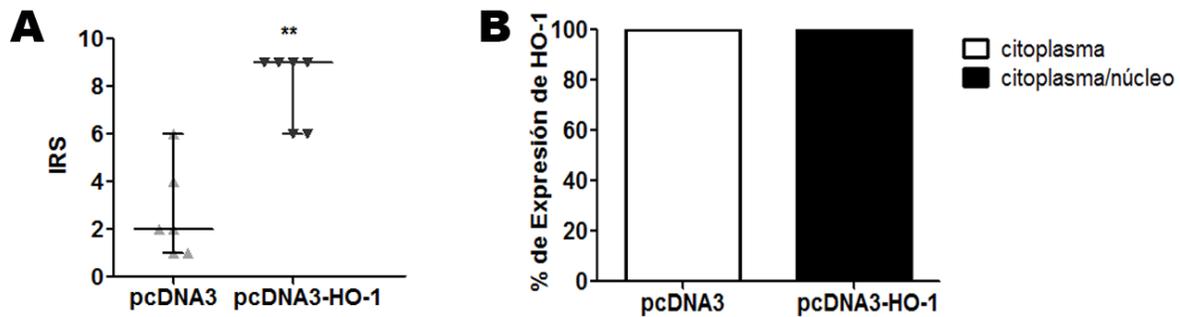
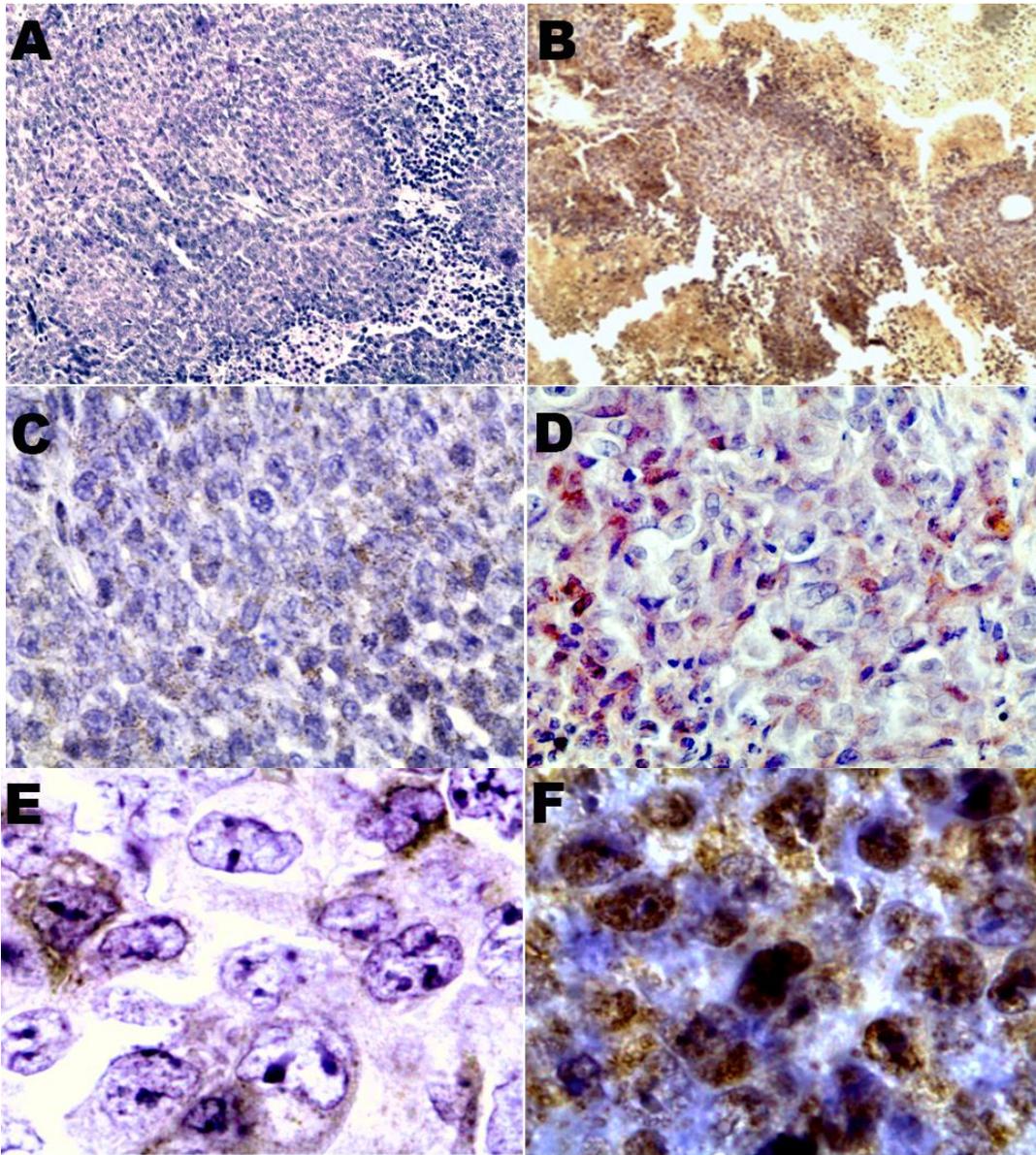


Figura 17. Efecto de la sobre-expresión genética de HO-1 sobre el índice mitótico (IM) e índice nuclear (IN) en el modelo de implante subcutáneo de células HCT116pcDNA3 y HCT116pcDNA3-HO-1 en ratones *nude*. A - D. Se muestran fotomicrografías representativas de cortes teñidos con hematoxilina y eosina. Figuras mitóticas en el tejido tumoral HCT116pcDNA3 10X (A), 40X (C) y en el tejido tumoral HCT116pcDNA3-HO-1 10X (B) y 40X (D). Flecha negra: núcleos en división. Flecha roja: mitosis atípica (*Mercedes Benz*). Flecha amarilla: mitosis atípica *explosiva*. E. El gráfico muestra la cuantificación de mitosis,  $**p = 0,002$ . F. No se observó diferencias en el IN.

En el análisis inmunohistoquímico se detectó expresión de HO-1 en las células epiteliales de los tumores. Esta expresión se incrementó fuertemente en los tumores que sobre-expresaban HO-1 (mediana IRS de tumores HCT116pcDNA3  $\pm$  SD =  $2 \pm 1,96$  vs mediana IRS HCT116pcDNA3-HO-1  $\pm$  SD =  $9 \pm 1,54$ ;  $p = 0,007$ , test de Mann Whitney; Figura 18A). Además, se confirmó la localización nuclear observada en los anteriores análisis, dando énfasis a su posible función como co-factor transcripcional. Se observó tinción nuclear y citoplasmática en el 100% de los tumores de los individuos inoculados con células HCT116pcDNA-HO-1(6/6) mientras que el 100% de los inyectados con células HCT116pcDNA3 (6/6) presentaron sólo marcación citoplasmática (Figura 18B). Se muestran fotos representativas de la expresión de HO-1 en tumores de CCR murino (Figura 19A-F).



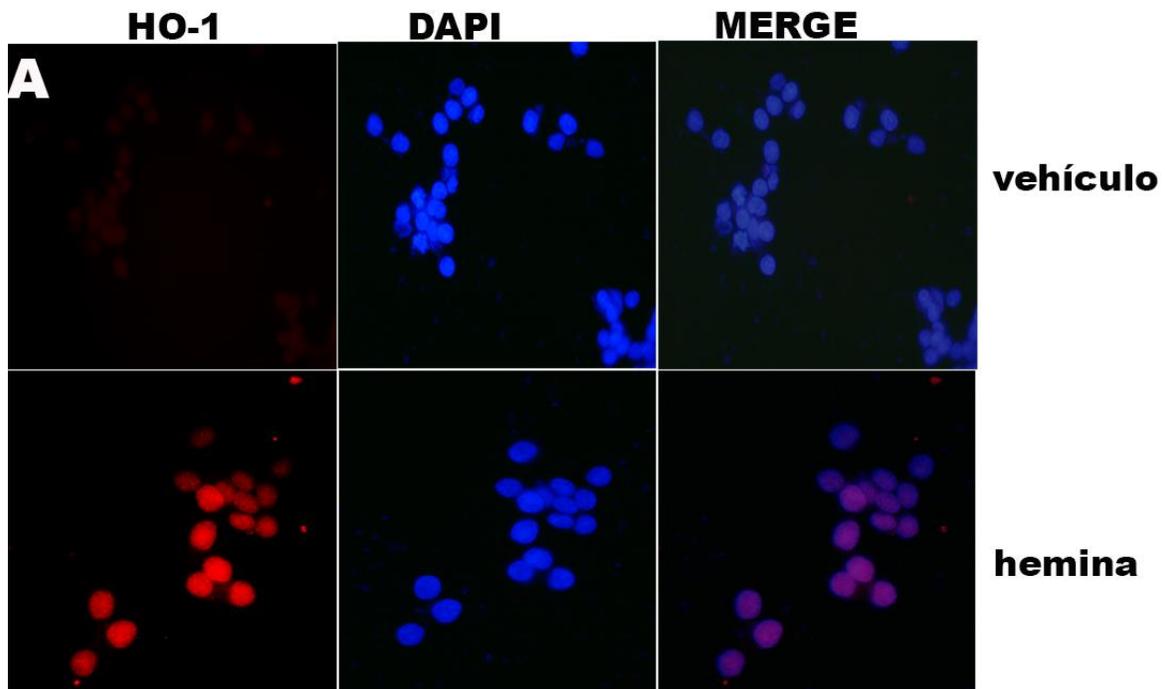
**Figura 18. Análisis de la expresión de HO-1 en el modelo transgénico. A.** Dot-plot mostrando los niveles (IRS) de HO-1 en tejidos tumorales de HCT116pcDNA3 y HCT116pcDNA3-HO-1;  $**p = 0,007$ ; test de Mann Whitney. **B.** Gráfico representando las tasas de HO-1 citoplasmática y citoplasmática/nuclear en tumores murinos. Sólo los tumores de los ejemplares inoculados con células HCT116pcDNA3-HO-1 mostraron localización citoplasmática y nuclear. Los tumores de los individuos inyectados con células HCT116pcDNA3 mostraron localización a nivel del citoplasma únicamente.

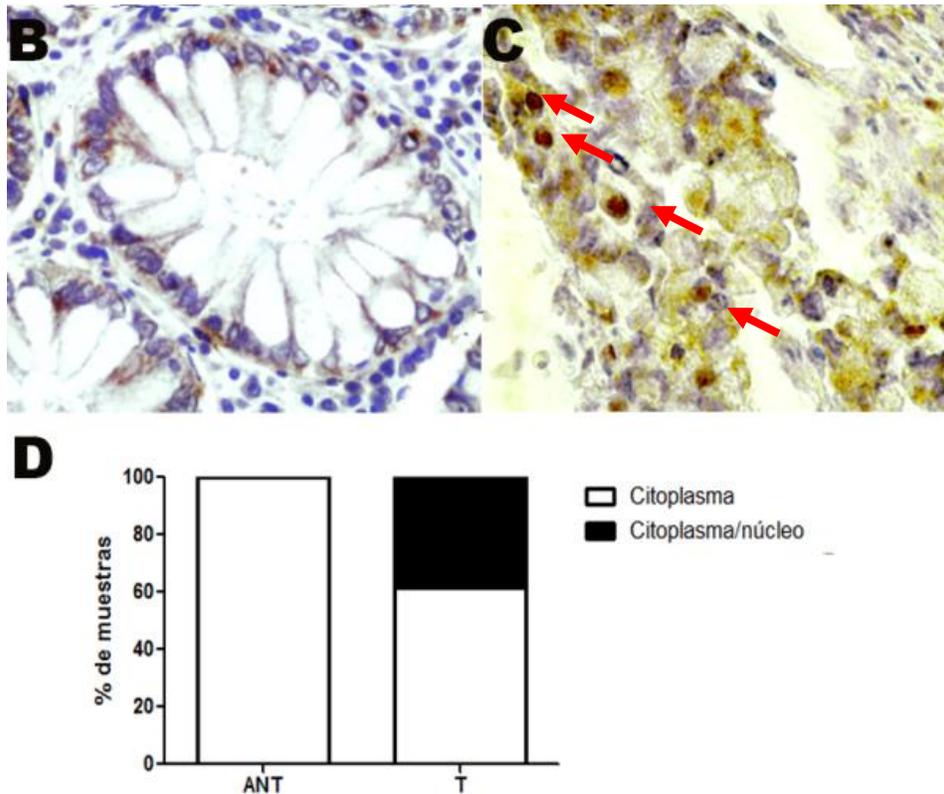


**Figura 19. Expresión de HO-1 en el modelo murino.** Secciones de tejidos de CCR murino fueron procesadas por IHQ como se describió en Materiales y Métodos. **A, C y E.** Fotomicrografías representativas de CCR murino HCT116pcDNA3, 10X (**A**) y 40X (**C**) y 1000X (**E**). **B, D y F.** Fotomicrografías representativas de CCR murino HCT116pcDNA3-HO-1, 10X (**B**), 40X (**D**) y 1000X mostrando marcación nuclear (**F**).

## La localización nuclear de HO-1 también se observa en una línea celular de CCR y en tejidos humanos

Habiendo observado la localización nuclear al aumentar la progresión del tumor en los modelos animales de CCR, se analizó la localización de HO-1 por inmunofluorescencia en la línea celular humana CCR HCT116 y por inmunohistoquímica en tejidos humanos de CCR. La expresión de HO-1 fue nuclear en las células HCT116 luego de la activación con hemina (Figura 20A). En los explantos humanos, los tejidos no malignos adyacentes al tumor positivos para HO-1, mostraron localización citoplasmática de la proteína (100%) (Figura 20B), mientras que los tumores positivos para HO-1, el 61,8% (42/68) mostró sólo localización citoplasmática y el 38,2% (26/68) mostró tanto localización de la proteína citoplasmática como nuclear (Figura 20C y D, flecha roja) ( $p = 0,0001$ ; prueba  $\chi^2$ ).





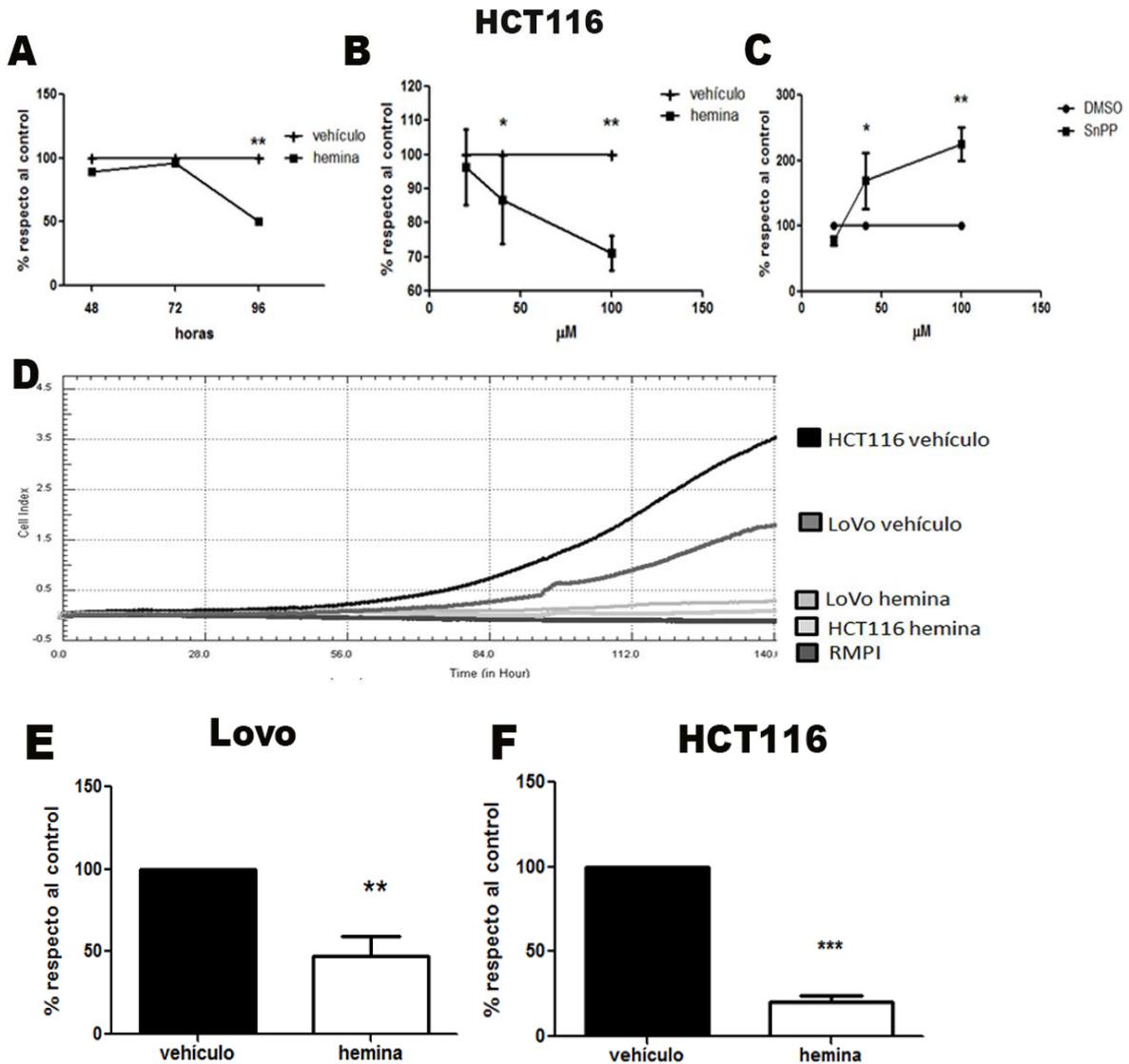
**Figura 20. Localización nuclear de HO-1 en las células HCT116 y en biopsias humanas.** **A.** Células HCT116 fueron tratadas con hemina (100  $\mu$ M) o vehículo por 24 h y se llevó a cabo una inmunofluorescencia para HO-1. Se realizó una tinción con DAPI para marcar los núcleos. **B.** Ausencia de localización nuclear de HO-1 en el tejido no maligno adyacente al tumor. **C.** Tinción inmunohistoquímica que muestra localización nuclear de HO-1 en tumores humanos (40X). Flechas rojas: marcación de la tinción nuclear. **D.** Gráfico representando las tasas de HO-1 nuclear y citoplasmática en tumores humanos. 61.8% de las muestras mostraron expresión citoplasmática, mientras que el 38.2% mostró ambas, tinción citoplasmática y nuclear ( $p = 0.0001$ , prueba  $\chi^2$ ).

### HO-1 disminuye la viabilidad de líneas de células CCR

A la proteína HO-1 se le ha asignado, principalmente, una actividad pro tumoral en la mayoría de los cánceres. Sin embargo, como ya se ha mencionado, se ha sugerido que en cáncer de próstata (Gueron et al, 2009) y en cáncer colorrectal (Becker et al, 2007) posee un papel antitumoral. Los resultados obtenidos en biopsias de CCR humanos corroboran que la expresión de HO-1 se incrementa en

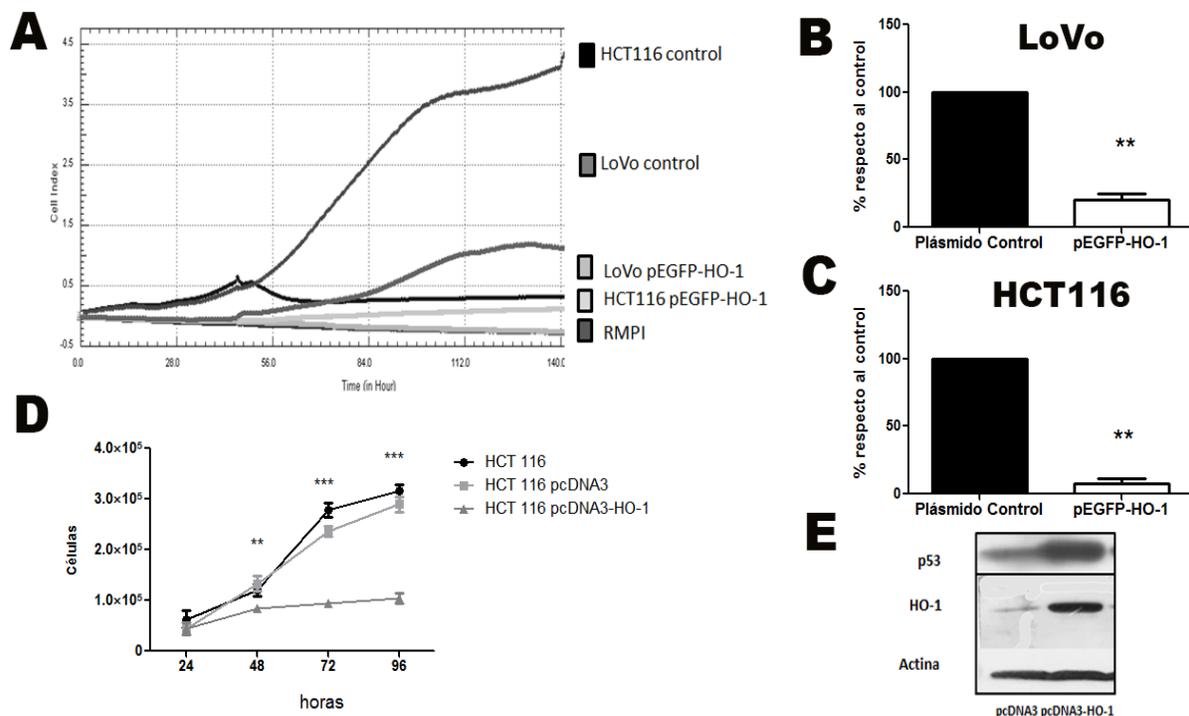
los tumores y este evento se asocia con una mejor evolución del paciente, lo que sugiere una actividad antitumoral de HO-1 en CCR. Por lo tanto, con el fin de investigar más a fondo el papel de HO-1 en la progresión de CCR, se evaluó la participación de HO-1 sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer colorrectal HCT116. Para ello, se realizó un análisis de tiempo-respuesta para comprobar la viabilidad celular después de la activación de HO-1 con hemina (100  $\mu\text{M}$ ) y se observó que el número de células disminuyó a las 96 horas de tratamiento ( $p < 0,001$ ; test Two Way ANOVA; Figura 21A). Tomando este punto de tiempo para futuros estudios de viabilidad celular, se procedió a realizar estudios de dosis-respuesta con hemina y con el inhibidor de la actividad de HO-1, SnPP. Se observó una disminución en la viabilidad de las células cuando se utilizaron dosis de 40  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de hemina ( $p < 0,05$ ; test Two Way ANOVA; Figura 21B). Por el contrario, un aumento en el número de células se observó cuando las células fueron tratadas con SnPP (10  $\mu\text{M}$ ) (Figura 21C).

Además, se midió la impedancia de las células HCT116 y LoVo grabado como un Índice Celular, que refleja el estado biológico de las células, incluyendo viabilidad, morfología, grado de adhesión y números de células mediante el sistema xCELLigence™. Se recogieron los datos mediante el *xCELLigence Data* que ofrece el mismo sistema (Figura 21D). El análisis en ambas líneas mostró que la activación de HO-1 resulta en una disminución del número de células ( $p = 0,019$ ;  $p = 0,0004$  respectivamente, prueba T) a las 96 horas post-tratamiento (Figura 21E y F).



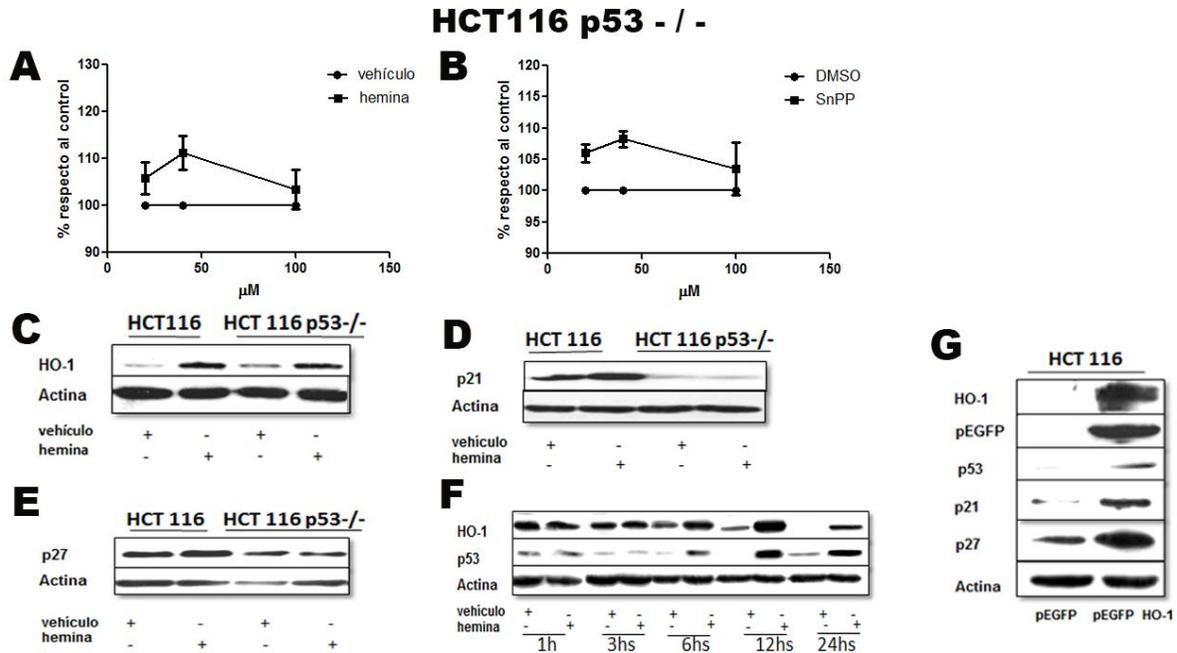
**Figura 21. Efectos de la modulación farmacológica de HO-1 sobre la viabilidad celular en dos líneas celulares de CCR. A.** Ensayo de viabilidad de tiempo-respuesta seguido del tratamiento con hemina o vehículo (100 μM). El número de células HCT116 decreció hacia las 96 h. **B y C.** Ensayo de viabilidad de dosis-respuesta mediante el tratamiento con hemina (**B**) (20 μM, 40 μM o 100 μM) o SnPP (**C**) (2 μM, 4 μM o 10 μM) en la línea celular HCT116. **D-F.** Ensayo de viabilidad celular mediante xCELLigence™ System (**D**) en las líneas celulares LoVo (**E**) y HCT116 (**F**). Sobreexpresión de HO-1 con hemina (100 μM) disminuyó el número de células (\*\* $p = 0,01$  y \*\*\* $p = 0,0004$ , prueba T).

Se repitió el ensayo de viabilidad luego de transfectar en forma transitoria con el plásmido pEGFP-HO-1 en las líneas celulares HCT116 y LoVo mediante el sistema xCELLigence ( $p = 0,0017$  y  $p = 0,0023$ , respectivamente; prueba T; Figura 22A, B y C) y en forma estable con el plásmido pcDNA3-HO-1 en las células HCT116 ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,001$ ; test Two Way ANOVA; Figura 22D). Se obtuvieron resultados similares a los conseguidos por la sobre-expresión farmacológica de la proteína. La eficiencia de la transfección se analizó mediante inmunofluorescencia (50% de las células, datos no mostrados) y *western blot* observándose también la expresión de p53 (Figura 22E).



**Figura 22. Efecto de sobre-expresión genética transitoria y estable de HO-1 sobre la viabilidad celular.** **A - C.** Ensayo de viabilidad luego de la modulación genética de HO-1 mediante el sistema xCELLigence en las líneas celulares LoVo (**B**) y HCT116 (**C**). La sobre-expresión de HO-1 mediante transfección transitoria con el plásmido pEGFP-HO-1 disminuyó el número de células ( $p = 0,0017$  y  $p = 0,0023$ , prueba T) y mediante una transfección estable en la línea celular HCT116 con el plásmido pcDNA3-HO-1 ( $***p < 0,0001$ ,  $**p < 0,001$ , Test Two Way ANOVA) (**D**). **E.** *Western blot* mostrando la eficiencia de la transfección estable con la expresión simultánea de p53. Se normalizó con Actina.

Teniendo en cuenta que el supresor tumoral p53 es importante para la regulación de la supervivencia celular y con frecuencia se encuentra desregulado en el CCR, se realizaron experimentos similares utilizando la línea celular HCT116 p53  $-/-$  que carece de la proteína p53. Curiosamente, el efecto del tratamiento con hemina y con SnPP en la viabilidad celular fue mitigado (Figura 23A y B). Esta diferencia observada entre las dos líneas celulares en cuanto a su respuesta a la regulación de HO-1 puede ser debido a la presencia de p53, que actúa a través de la regulación de la expresión de p21, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CDK) y regulador de la progresión del ciclo celular. Por eso, se analizó si la activación de HO-1 induce la expresión de p53, p21 y otras proteínas relacionadas con la detención del ciclo celular y viabilidad celular. Como se ve en la Figura 23C, la modulación con hemina produjo sobre regulación de HO-1 en ambas líneas celulares (con y sin p53), lo que sugiere que la expresión de HO-1 es independiente de p53. También la regulación de HO-1 con hemina fue acompañado con un aumento de la p21, p27 (Figura 23D y E) y una disminución de ciclina D1 (no se muestra) en las células HCT116. En cambio, en la línea de células que carecen de p53, la sobreexpresión de HO-1 no fue acompañado por la sobre regulación de p21 o p27 (Figura 23D y E). Los análisis de tiempo-respuesta realizados con hemina revelaron que se produce la inducción de p53 simultáneamente con la inducción de HO-1 (Figura 23F). Puesto que se ha demostrado que los moduladores HO-1 muestran efectos directos en algunos procesos celulares no mediados por la actividad de HO-1 (La et al, 2009) se procedió a sobre-expresar la enzima genéticamente con el fin de confirmar los resultados obtenidos con la modulación farmacológica de HO-1. Se repitió el ensayo de *western blot* para las misma proteínas con lisados de células HCT116 transfectadas en forma transitoria con el plásmido pEGFP-HO-1 y se observaron los mismos resultados (Figura 23G).



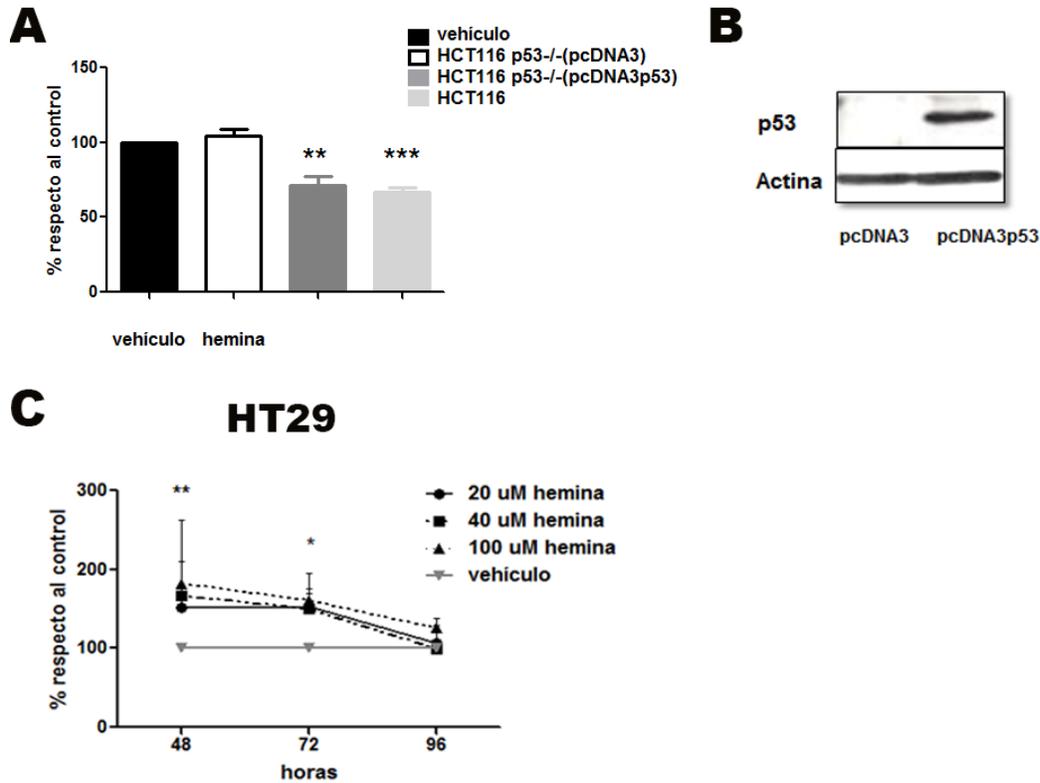
**Figura 23. Efectos de la modulación farmacológica de HO-1 sobre la viabilidad celular y sobre las proteínas relacionadas con el ciclo celular en las líneas celulares HCT116 y HCT116 p53<sup>-/-</sup>.** **A y B.** Las células HCT116 p53<sup>-/-</sup> fueron tratadas por 24 h con hemina o vehículo (100 µM) y SnPP o DMSO (10 µM) para medir viabilidad celular y no se encontraron diferencias entre los tratamientos con sus respectivos controles. Los lisados proteicos de las líneas celulares HCT116 y HCT116 p53<sup>-/-</sup> fueron sometidos a electroforesis y transferidos para ver expresión de HO-1 (**C**), p21 (**D**) y p27 (**E**). **F.** Las células HCT116 fueron tratadas, durante los tiempos indicados, con hemina o vehículo (100 µM). La expresión de HO-1 y p53 fue analizada por *western blot*. Se usó Actina como control de carga. **G.** Expresión proteica de HO-1, pEGFP, p21, p53 y p27 en lisados de células HCT116 transfectadas en forma transiente con el plásmido pEGFP-HO-1 y plásmido control. Se utilizó Actina como control de carga.

Dado que ambas líneas celulares HCT116 difieren principalmente en la presencia o ausencia de p53, se infirió que este supresor de tumor podría estar implicado en el efecto de HO-1 en la viabilidad celular. Por ello, para profundizar más en la implicancia de la presencia de p53 se reintrodujo el gen supresor de tumores en la línea celular HCT116 p53<sup>-/-</sup> mediante una transfección transitoria con un plásmido pcDNA3-p53 y luego se realizó un análisis de viabilidad celular. Se detectó que las líneas celulares con p53 alterado no respondieron a la modulación de HO-1 o

mostraron un ligero aumento en la viabilidad celular con respecto al control, como se ha observado previamente ( $p = 0,361$ ; test de Mann Whitney; Figura 23A). Sin embargo, cuando p53 se reintrodujo en las células, su viabilidad disminuyó después del tratamiento con hemina ( $p = 0,0047$ ; test de Mann Whitney; Figura 23A) presentando un comportamiento similar a las células HCT116 que contienen p53 ( $p = 0,0006$ ; test de Mann Whitney; Figura 24A).

La eficiencia de la transfección se analizó por *western blot* (Figura 24B). y también por inmunofluorescencia (no se muestra), con 10% de células HCT116 p53 -/- que expresan la proteína p53 después de la transfección.

Adicionalmente se trabajó con otra línea celular, la HT29 que tiene una mutación en el codón 273 del gen p53. Esta mutación altera las secuencias específicas de p53 que son directamente responsables de la unión de ADN, permitiendo de este modo que el ciclo celular proceda sin control (Oliver et al, 2010). Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad de tiempo y dosis-respuesta y se observó que el número de células se mantuvo sin cambios o se vio incrementado a las 48 y 72 h ( $p = 0.01$ ,  $p = 0.05$ ; test Two Way ANOVA; Figura 24C). Estos resultados sugieren que un p53 funcional es necesario para que HO-1 produzca una inhibición de la viabilidad celular.

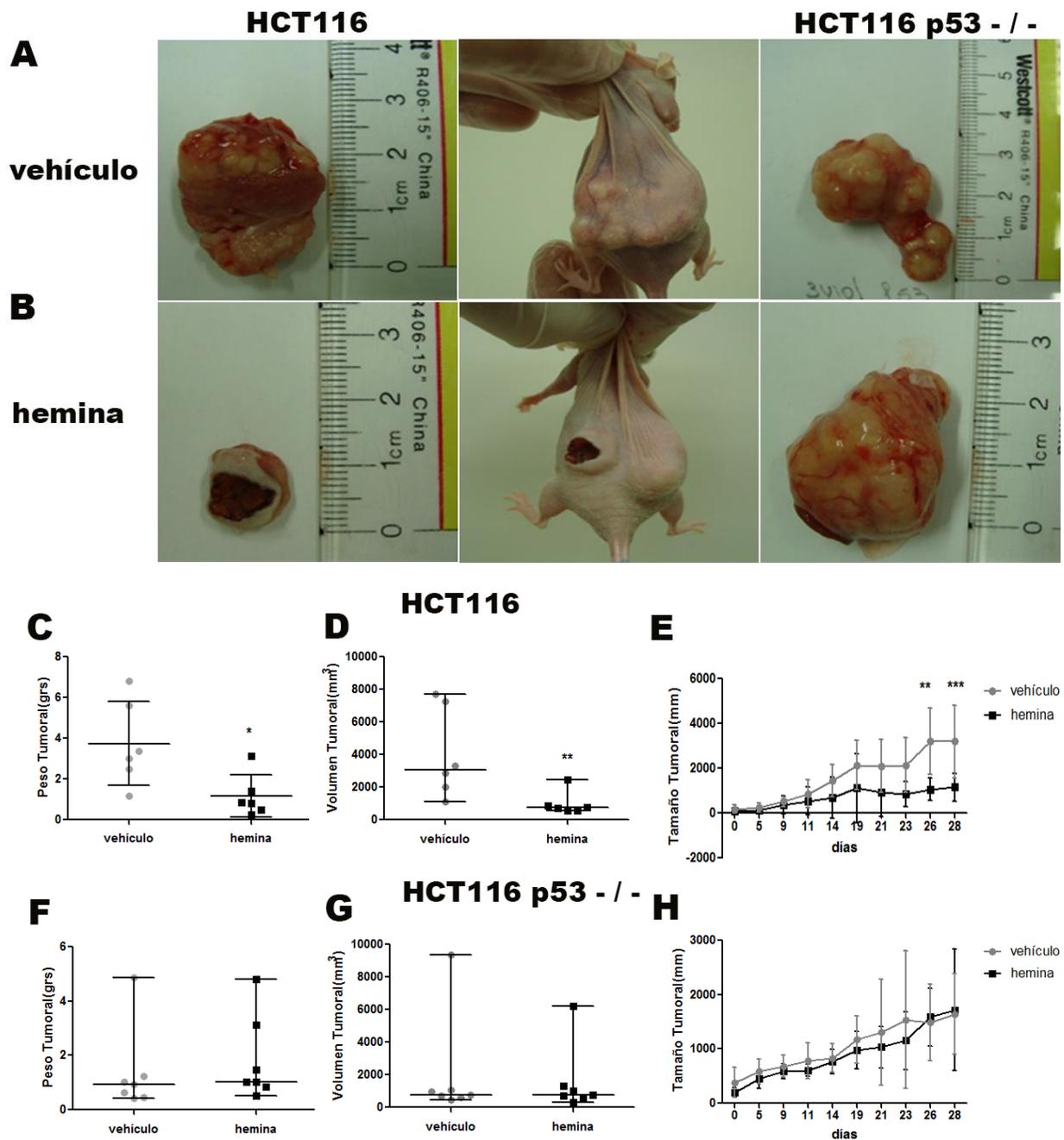


**Figura 24. Participación de p53 funcional y HO-1 en la viabilidad celular. A.** Ensayo de viabilidad en la línea celular HCT116 p53<sup>-/-</sup> transfectada con pcDNA3 o pcDNA3 p53 y en la línea celular in HCT116 seguido de tratamiento con hemina (\*\* $p = 0.0047$ , \*\*\* $p = 0.0006$ ; test de Mann Whitney). **B.** Análisis por *western blot* mostrando la sobre expresión de p53 en la línea celular HCT116 p53<sup>-/-</sup>. **C.** Ensayo de viabilidad celular en la línea HT29 que contiene p53 mutado. Análisis de dosis (20, 40 and 100  $\mu\text{M}$ ) y tiempo (48, 72 y 96 h)-respuesta. Tratamiento con hemina llevo a un incremento del número de células a las 48 y 72 horas de tratamiento (\*\* $p = 0.01$ , \* $p = 0.05$ , test Two Way ANOVA).

**La sobre-expresión de la HO-1 en células que tienen el gen supresor de tumores p53 en estado salvaje produce una disminución de la carga tumoral en modelos murinos de CCR.**

Dado que se observó *in vitro*, en diferentes líneas celulares, y por diferentes métodos que la presencia de p53 es necesaria para que HO-1 ejerza sus efectos

antitumorales, a continuación se comprobó *in vivo* el efecto de la sobreexpresión de HO-1 en presencia y en ausencia de p53. Como se describió en Materiales y Métodos se utilizaron 12 ratones N:NIH (S)-Fox1nu (*nude*) a quienes se les implantó en forma subcutánea, en el flanco derecho, la línea celular HCT116 y en el flanco izquierdo se les inyectó la línea celular HCT116 p53  $-/-$  (Figura 25A y B). A 6 de ellos se los trató con hemina y a 6 con vehículo. Se hallaron diferencias significativas en el peso tumoral y volumen tumoral de los tratados con respecto a los controles (mediana  $\pm$  SD = 0.8350 g  $\pm$  1,04 versus mediana  $\pm$  SD = 3,195 g  $\pm$  2,07 respectivamente;  $p = 0,026$  y mediana  $\pm$  SD = 740.6 mm<sup>3</sup>  $\pm$  738 versus mediana  $\pm$  SD = 3082 mm<sup>3</sup>  $\pm$  2770,  $p = 0,0087$ ; test de Mann Whitney; Figura 25C. y D) y se detectó que la tasa de crecimiento de los tumores HCT116 que fueron tratados con hemina fue significativamente menor que los tratados con vehículo ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ; test Two Way ANOVA; Figura 25E). No se observaron diferencias significativas en el volumen tumoral y peso tumoral entre los tumores HCT116 p53  $-/-$  que fueron tratados con hemina y vehículo (mediana  $\pm$  SD = 1.03 g  $\pm$  1,55 versus mediana  $\pm$  SD = 0.93 g  $\pm$  1,57, respectivamente;  $p = 0,317$  y mediana  $\pm$  SD = 758.7 mm<sup>3</sup>  $\pm$  2076 versus mediana  $\pm$  SD = 765.8 mm<sup>3</sup>  $\pm$  3251,  $p = 1$ ; test de Mann Whitney; Figura 25F y G), no se encontraron diferencias en el crecimiento de los tratados y los controles ( $p > 0.05$ ; test Two Way ANOVA; Figura 25H).

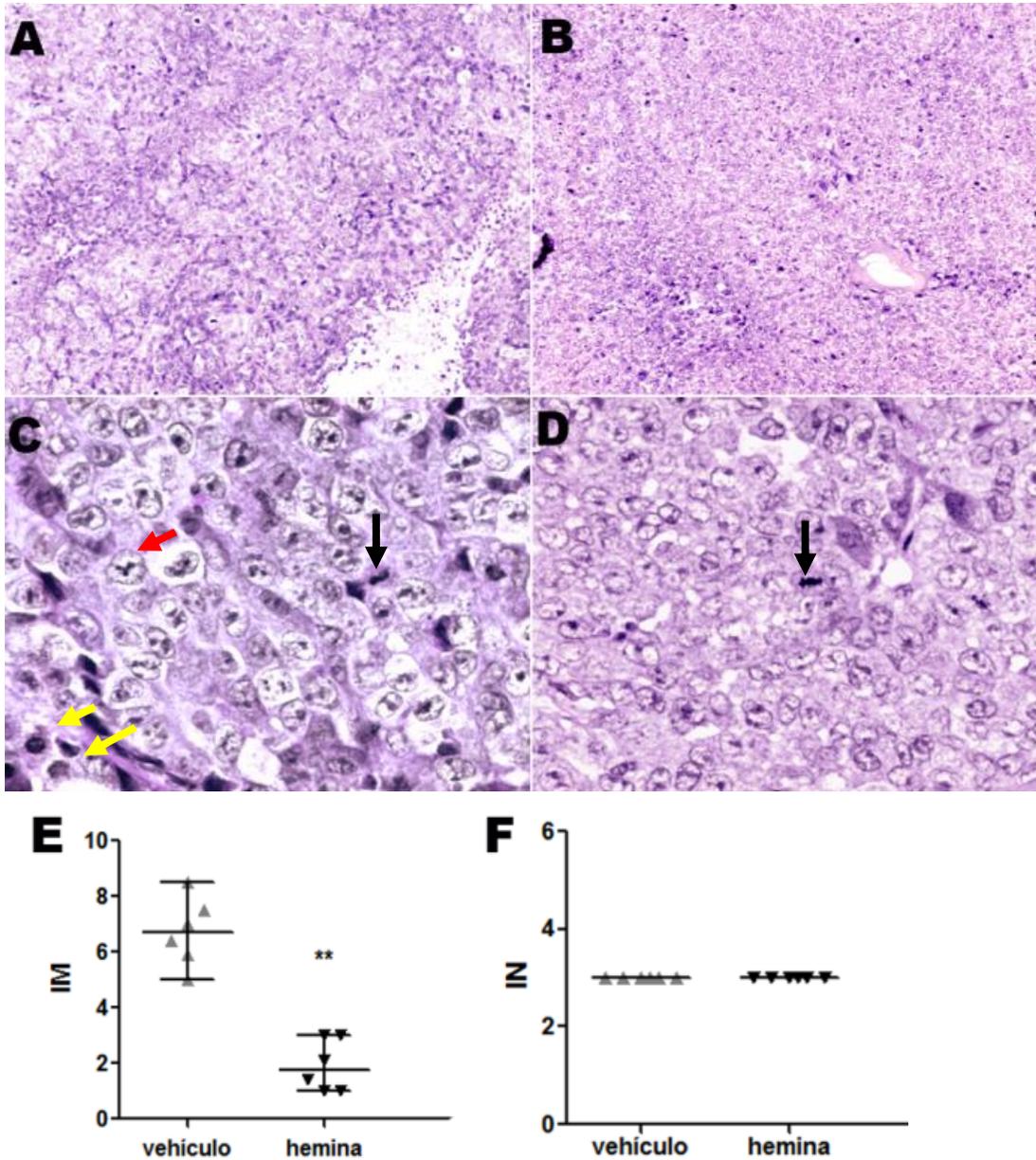


**Figura 25.** Efecto de la sobre-expresión de HO-1 en presencia y ausencia del gen supresor de tumores p53 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de implante subcutáneo de células HCT116 y HCT116 p53 -/- en ratones *nude*. Evaluación del efecto de la sobre-expresión de HO-1 en presencia y ausencia de p53 sobre la carga tumoral (peso y volumen). Los animales (n = 6) fueron tratados con 9 dosis (0,2 mg/kg) de hemina o vehículo tal como se describió en Materiales y Métodos. **A y B.** Las fotos

muestran tumores representativos de cada tratamiento en cada línea celular in vivo y luego de su disección. **A.** Individuo tratado con vehículo. En su flanco izquierdo tumor HCT116 en su flanco derecho tumor HCT116 p53  $-/-$ . **B.** Individuo tratado con hemina. En su flanco izquierdo tumor HCT116 en su flanco derecho tumor HCT116 p53  $-/-$ . **C - E.** Tumores HCT116. En los gráficos se representa la mediana del peso (**C**), volumen tumoral (**D**) ( $*p = 0.026$ ,  $**p = 0.0087$ ; test de Mann Whitney) y el crecimiento tumoral a lo largo de los 28 días (**E**) en cada grupo de ratones ( $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , Two Way ANOVA). **F - H.** Tumores HCT116 p53  $-/-$ . Mediana del peso (**F**), volumen tumoral (**G**) y el crecimiento tumoral a lo largo de los 28 días (**H**) en cada grupo de ratones ( $p = 0,317$ ,  $p = 1$ ; test de Mann Whitney,  $p > 0.05$ ; Two Way ANOVA).

Como se describió previamente, la sobreexpresión de HO-1 en las células de la línea celular HCT116 produjo una disminución de la proliferación celular, no así en la línea celular HCT116 p53  $-/-$ . Se decidió entonces verificar si estos resultados se repetían in vivo conduciendo a la diferencia detectada en la carga tumoral. Con este objetivo se obtuvo el índice mitótico en cortes teñidos con hematoxilina y eosina. Congruentemente con lo observado en los experimentos realizados con las células HCT116 y HCT116 p53  $-/-$  en cultivo, se pudo detectar en los tumores HCT116 tratados con hemina una disminución significativa en el número de figuras mitóticas comparando los tumores de los ratones tratados con vehículo (mediana  $\pm$  SD =  $1,75 \pm 1,2$  versus mediana  $\pm$  SD =  $6,65 \pm 1,07$  figuras mitóticas por 10 campos, respectivamente,  $p = 0,0022$ ; test de Mann Whitney; Figura 26A - F), esta diferencia no se observó en los tumores HCT116 p53  $-/-$  (mediana  $\pm$  SD =  $13,93 \pm 1,39$  versus mediana  $\pm$  SD =  $13,48 \pm 1,11$  figuras mitóticas por 10 campos, respectivamente,  $p = 0,87$  test de Mann Whitney; Figura 27A - F) . El grado de pleomorfismo nuclear fue alto para todos los tumores. En la mayoría de los tumores se observan zonas de necrosis, predominantemente en la zona central.

## HCT116



**Figura 26.** Efecto de la sobre-expresión farmacológica de HO-1 sobre el índice mitótico (IM) e índice nuclear (IN) en el modelo de implante subcutáneo de células HCT116 en ratones *nude*. **A - D.** Se muestran fotomicrografías representativas de cortes de tejido tumoral HCT116 teñidos con hematoxilina y eosina. Figuras mitóticas en tumores tratados con vehículo 10X (**A**), 40X (**C**) y hemina 10X (**B**) y 40X (**D**). **E.** El gráfico muestra la cuantificación de mitosis, \*\*  $p = 0,0022$ , test de Mann Whitney. **F.** Todos los tumores tuvieron un IN = 3. Flechas negras: figuras mitóticas. Flecha roja: mitosis atípica *Mercedes Benz*. Flecha amarilla: mitosis atípica *explosiva*.

## HCT116 p53 - / -

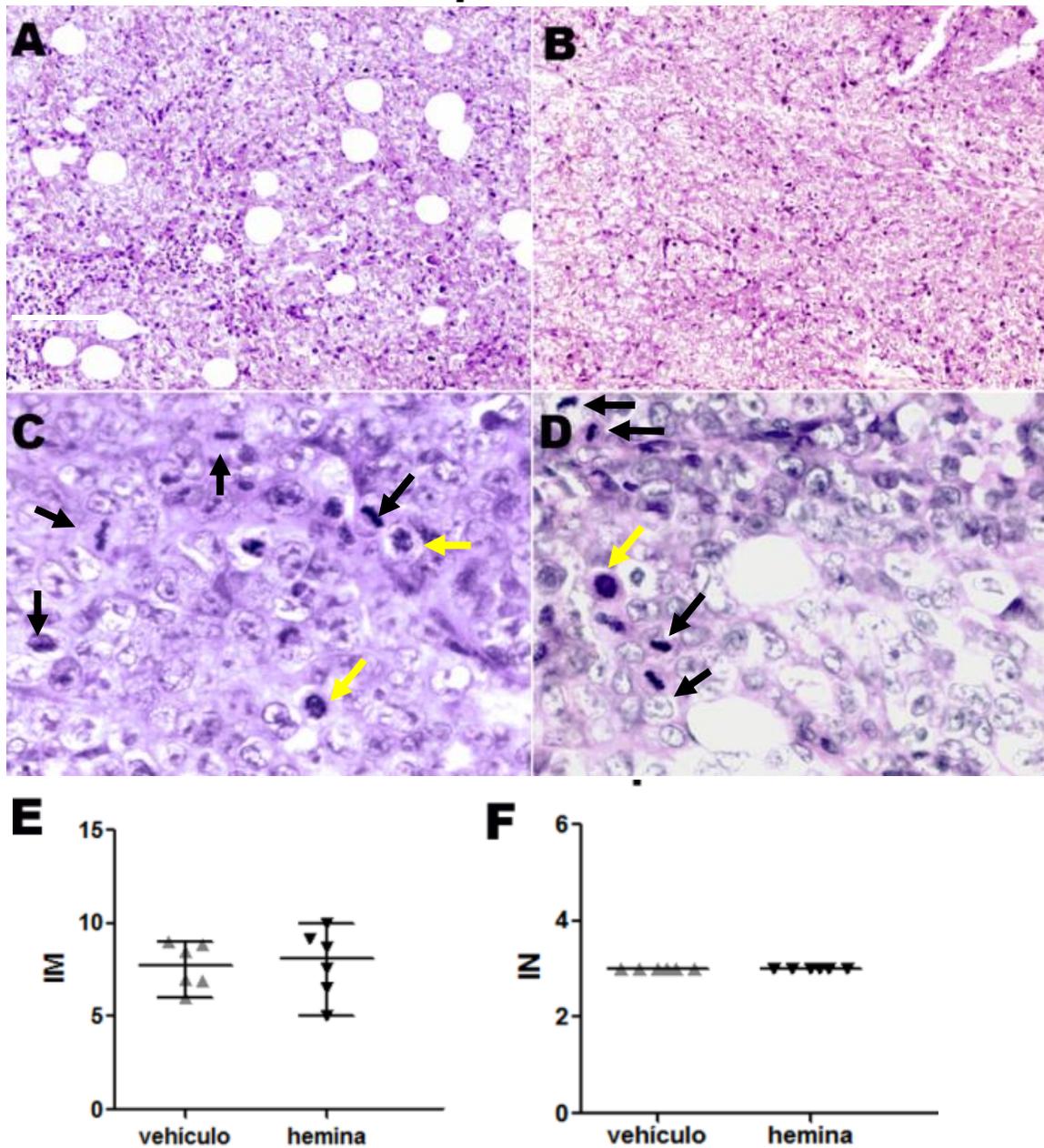
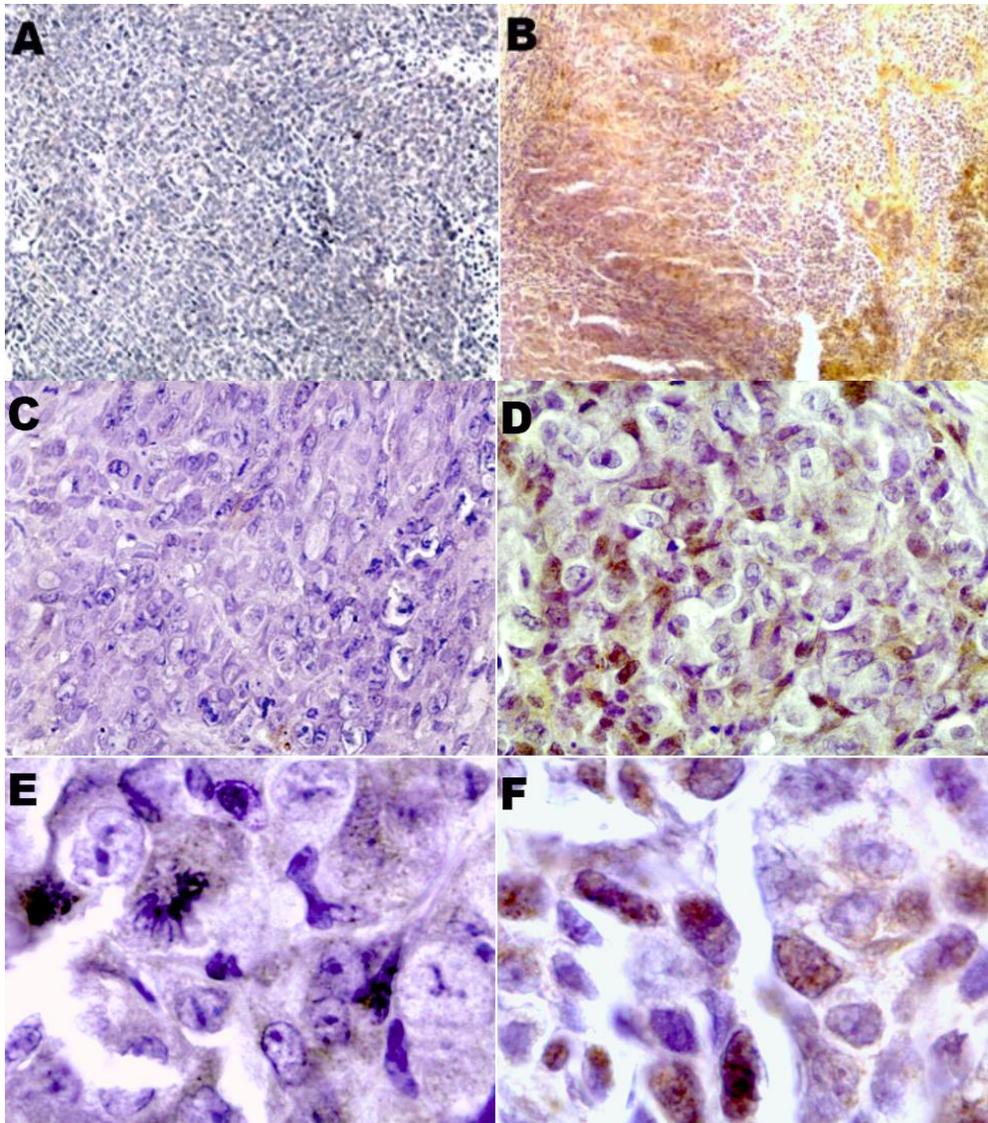
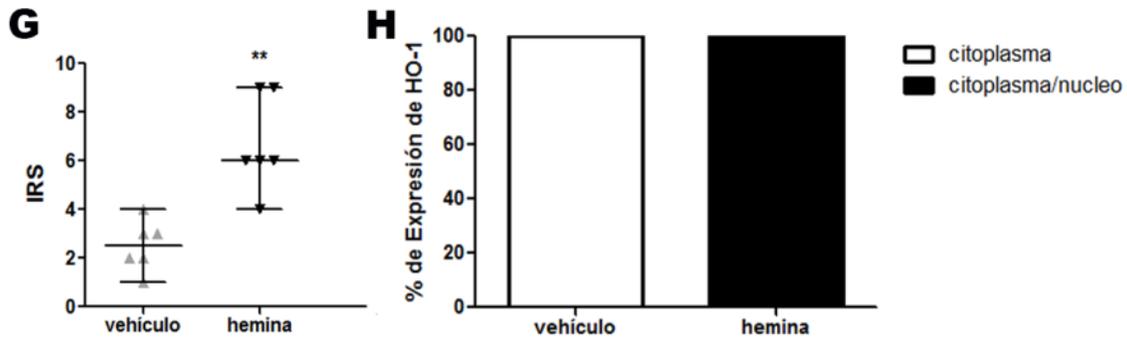


Figura 27. Efecto de la sobre-expresión farmacológica de HO-1 sobre el índice mitótico (IM) e índice nuclear (IN) en el modelo de implante subcutáneo de células HCT116 p53 -/- en ratones *nude*. A - D. Secciones de cortes de tejido tumoral HCT116 p53 -/- teñidos con hematoxilina y eosina. Figuras mitóticas en tumores tratados con vehículo 10X (A), 40X (C) y hemina 10X (B) y 40X (D). E y F. Los gráficos representan el IM ( $p = 0,81$ ; test de Mann Whitne) y el IN de cada tratamiento. Flechas negras: figuras mitóticas. Flecha amarilla: mitosis atípica *explosiva*.

El análisis inmunohistoquímico reveló una mayor intensidad de tinción en los tumores HCT116 tratados con hemina (Figura 28B y D) que aquellos que habían sido tratados con vehículo (Figura 28A y C) (mediana IRS  $\pm$  SD =  $6 \pm 1,96$  vs  $2,5 \pm 1,04$ ;  $p = 0,0062$ ; Figura 28G). También en estos tumores se estudió la localización subcelular de HO-1. Nuevamente, se detectó que en los tumores tratados con hemina, la proteína se encontraba localizada en el 100% de los tumores (6/6) en citoplasma y núcleo (Figura 28F); mientras que en aquellos tratados con vehículo (Figura 28E) ninguno presentó localización nuclear, fue exclusivamente citoplasmática (Figura 28H).

### HCT116





**Figura 28. Características de la expresión de HO-1 en los tejidos tumorales del modelo subcutáneo de células HCT116.** Se muestran fotos representativas de tejido tumoral tratados con vehículo 10X (A), 40X (C) y 1000X (E) y tratados con hemina 10X (B), 40X (D) y 1000X (F). G. Esquema representativo del IRS, \*\* $p = 0,0062$ ; test de Mann Whitney. H. Se observa la cuantificación del porcentaje citoplasmático y citoplasmático/nuclear de HO-1 en los tumores de los ratones tratados con vehículo y con hemina.

De la misma manera, se evaluó la expresión de HO-1 y la localización subcelular en secciones consecutivas de tejido de tumores originados por células HCT116 p53  $-/-$ . La expresión fue similar a lo visto anteriormente, los tumores tratados con hemina (Figura 29B y D) mostraron mayor expresión de HO-1 que aquellos tratados con vehículo (Figura 29A y C) (mediana IRS  $\pm$  SD =  $6 \pm 1,96$  vs  $2 \pm 1,69$ ,  $p = 0,0062$ , Figura 29G). La localización de la enzima mostró un patrón similar a los tumores HCT116. Cuando fueron tratados con hemina la localización fue citoplasmática y nuclear (Figura 29F) en el 100% de los casos (6/6), mientras que los que fueron tratados con vehículo sólo se tiñieron a nivel citoplasmático (6/6) (Figura 29E). Este resultado refleja que, cuando HO-1 es sobre-expresada, transloca a núcleo independientemente de la presencia de p53, pero sí requiere del gen supresor de tumores en su estado salvaje, para disminuir la carga tumoral.

## HCT116 p53 - / -

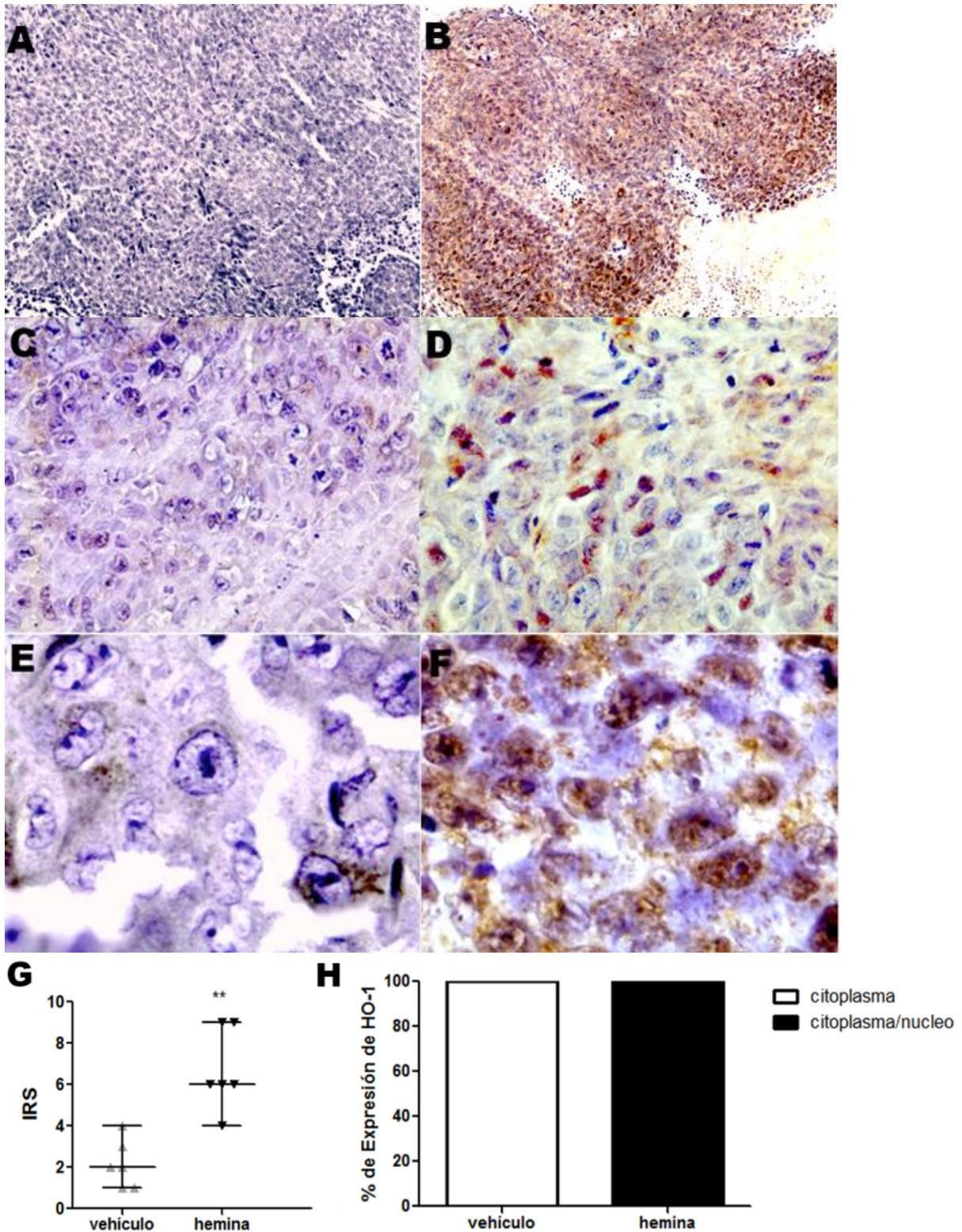


Figura 29. Características de la expresión de HO-1 en los tejidos tumorales del modelo subcutáneo de células HCT116 p53 -/-. Se muestran fotos representativas de tejido tumoral tratados con vehículo 10X (A), 40X (C) y 1000X (E) y tratados con hemina

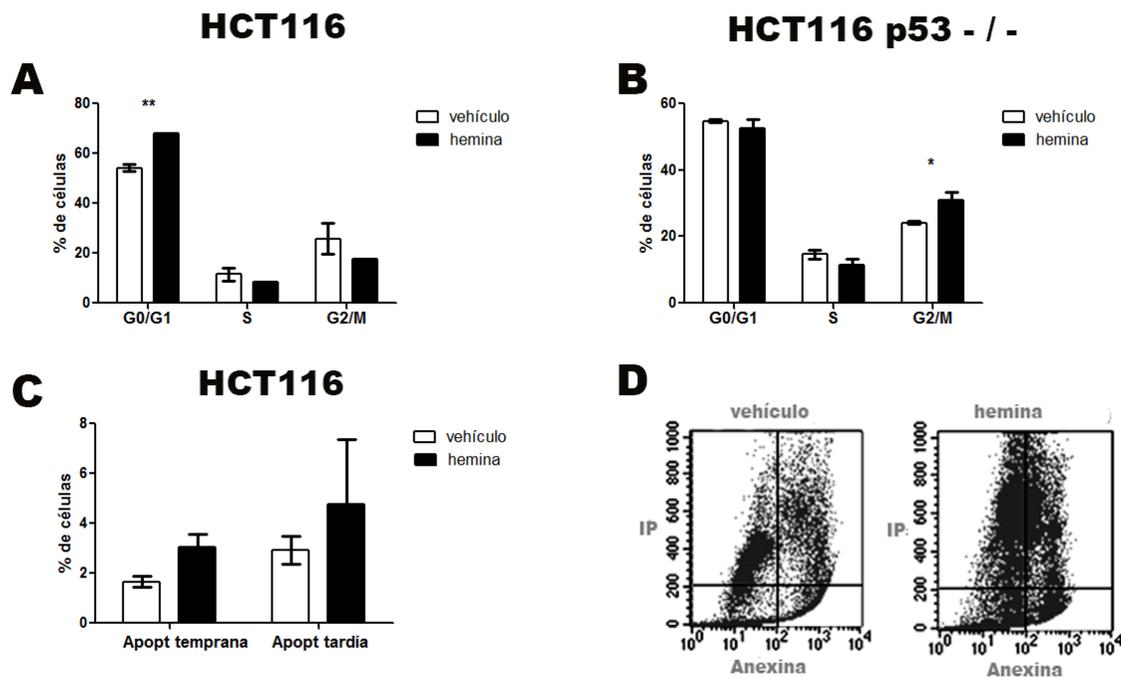
10X (B), 40X (D) y 1000X (F). G. Esquema representativo del IRS,  $**p = 0,0062$ ; test de Mann Whitney. H. Se observa la cuantificación del porcentaje citoplasmático y citoplasmático/nuclear de HO-1 en los tumores de los ratones tratados con vehículo y con hemina.

### **La sobreexpresión de HO-1 provoca la detención del ciclo celular, apoptosis y un aumento de la actividad de caspasa-3.**

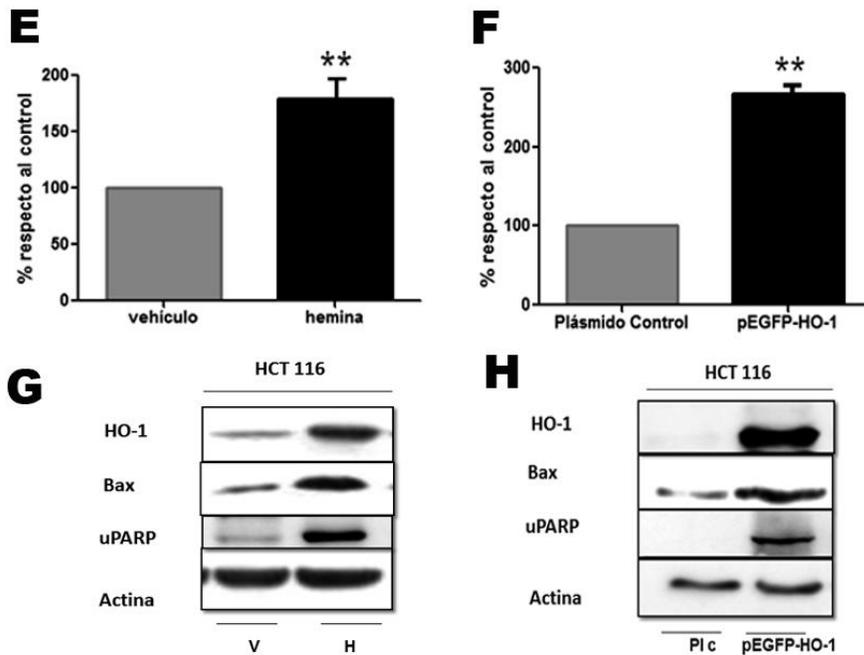
Subsecuentemente se analizaron los posibles mecanismos subyacentes a los efectos de HO-1 sobre la viabilidad celular y la disminución de la carga tumoral. Para ello, se estudió si la modulación farmacológica de HO-1 induce la detención del ciclo celular por tinción con IP seguida de citometría de flujo. Como se observa en Figura 30A, el tratamiento hemina induce un arresto celular en la fase  $G_0/G_1$  en la línea celular HCT116 ( $p = 0,004$ ; test de Mann Whitney). No se observó detención en la fase  $G_0/G_1$  en células HCT116 p53  $-/-$  aunque sí fue inducida una detención en la fase  $G_2/M$  ( $p = 0,02$  Figura 30B; test de Mann Whitney). De acuerdo a un trabajo publicado por Zambetti (1992), el gen p53 de tipo salvaje y su producto génico, parecen regular negativamente la proliferación celular. Este gen es capaz de inhibir la transformación de células primarias en cultivo debido a oncogenes y puede suprimir la capacidad de las células transformadas de desarrollar tumores en animales. Cuando el gen p53 en su estado salvaje se reintroduce en las células transformadas y se expresa en exceso, el producto del gen bloquea la de proliferación celular, y estas células se acumulan en la fase  $G_1$  tardía del ciclo celular.

Posteriormente, se consideró si la activación de HO-1 también podría regular la apoptosis en las células HCT116 y para este propósito se llevó a cabo una marcación con anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) Como se muestra en la Figura 30C y D, la activación de HO-1 induce un aumento en la tinción con anexina V en estas células ( $p = 0,01$ ; test de Mann Whitney), lo que sugirió que la modulación de HO-1 está implicada en la regulación de la apoptosis.

Dado que la de caspasa-3 desempeña un papel central en la ejecución de la apoptosis temprana luego de un estímulo apoptótico (Rodríguez-Hernández et al, 2006; Scabini et al, 2001; Varghese et al, 2003; Nicholson et al, 1995,) se procedió a medir su actividad luego de la modulación de HO-1. Se observó que la sobreexpresión genética (Figura 30E) y farmacológica (Figura 30F) de HO-1 en las células HCT116 produce un aumento de la actividad de caspasa-3 (\*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ; test de Mann Whitney). Con el fin de analizar más a fondo los mecanismos apoptóticos inducidos por HO-1 analizamos la expresión de Bax, una proteína pro-apoptótica que se sabe es regulada por p53 (Chipuk et al, 2004) y la expresión de uPARP, quien en situaciones de estrés puede conducir a la muerte celular por activación de p53 o consumo desmedido de ATP (Martínez et al, 2005). Se observó un aumento en los niveles de estas proteínas en las células HCT116 cuando se indujo farmacológica y genéticamente la HO-1 (Figura 30G y H).



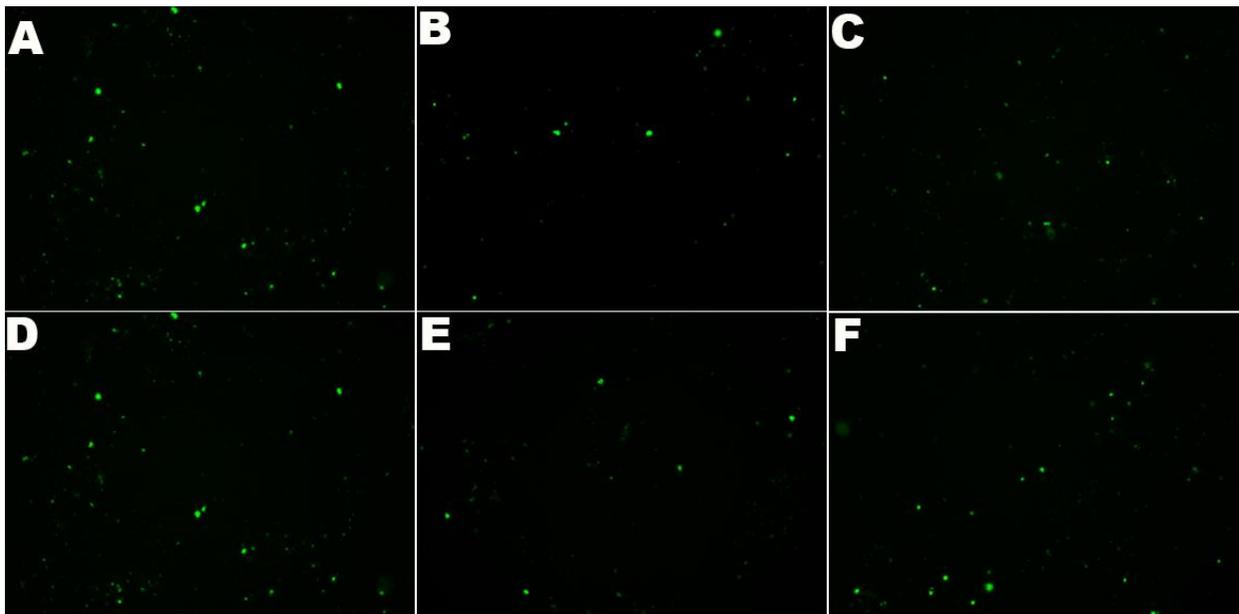
## HCT116



**Figura 30. HO-1 produce arresto del ciclo celular en  $G_0/G_1$  y apoptosis temprana en las células HCT116, aumenta la actividad de caspasa-3 y modula la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y de uPARP. A y B.** Distribución de las fases del ciclo celular por determinación del contenido de ADN llevado a cabo por citometría de flujo usando coloración con IP. El histograma muestra el porcentaje de células de cada línea celular, HCT116 (**A**) y HCT116 p53<sup>-/-</sup> (**B**), localizada en cada fase del ciclo celular luego del tratamiento con hemina o vehículo (100  $\mu$ M). Se observa arresto celular en la fase  $G_0/G_1$  en aquellas células que tienen p53 salvaje (\*\* $p = 0,004$ ) y en  $G_2/M$  en aquellas células que carecen de p53 (\* $p < 0,05$ ). **C y D.** Detección de apoptosis en las células HCT116. Las células fueron analizadas por citometría de flujo empleando coloración de anexina-V. Porcentaje de células en apoptosis temprana (\* $p = 0,01$ ) y apoptosis tardía ( $p > 0,17$ ) luego del tratamiento con hemina (100  $\mu$ M) y vehículo. **E.** La actividad de caspasa-3 aumenta un 179 % luego de la modulación farmacológica de HO-1 con hemina (100  $\mu$ M) con respecto a la actividad medida en las células tratadas con vehículo (100  $\mu$ M) (\*\* $p = 0,001$ ) y se incrementa un 267 % cuando HO-1 se sobre-expresa genéticamente (\*\* $p = 0,001$ ) (**F**). En todos los casos se aplicó test de Mann Whitney. **G.** Se indujo HO-1 a las células HCT116 de manera farmacológica y genéticamente y se determinó la expresión de HO-1, Bax y uPARP. Se utilizó Actina como control de carga.

## La hemina no es toxica a 100 $\mu\text{M}$

La hemina es bien conocida por su efecto de aumentar la expresión y actividad de la HO-1, pero están muy discutidos sus efectos secundarios sobre los procesos celulares y su toxicidad (Dang et al, 2011; Robinson et al, 2009). Para confirmar que los efectos observados se debían efectivamente a la actividad de la enzima y no a la droga, se realizó un ensayo de toxicidad a diferentes concentraciones de hemina, barriendo un rango de 0 a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 31A - F).

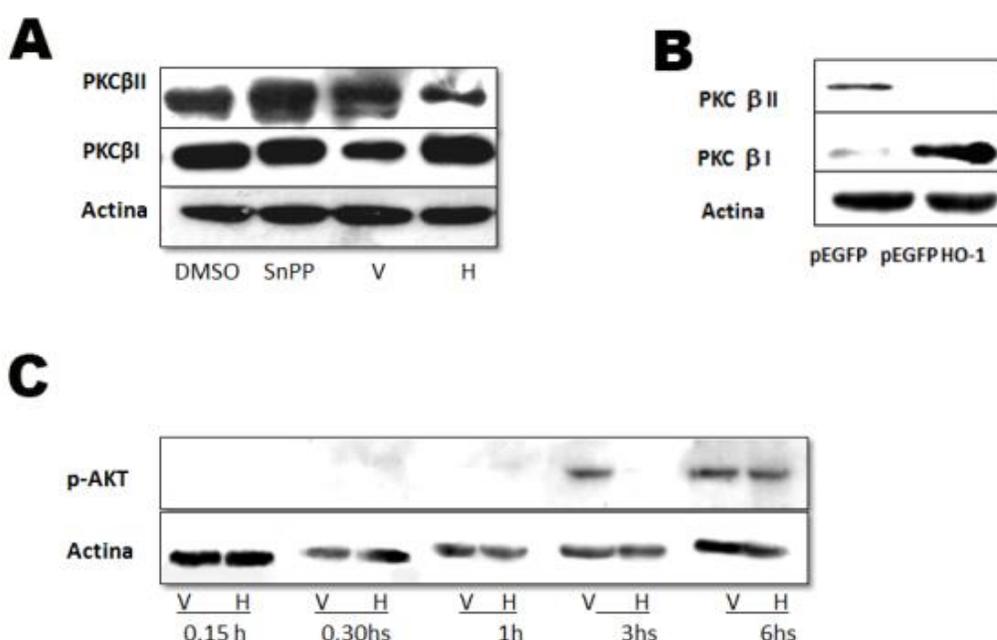


**Figura 31. Ensayo de toxicidad para la hemina.** Las fotografías muestran la proporción de células que emiten fluorescencia como indicador de necrosis a 0  $\mu\text{M}$  (A), 2  $\mu\text{M}$  (B), 5  $\mu\text{M}$  (C), 10  $\mu\text{M}$  (C), 20  $\mu\text{M}$  (D), 50  $\mu\text{M}$  (E), 100  $\mu\text{M}$  (F). No se encontraron diferencias con respecto al control.

## HO-1 modula importantes vías en el CCR

Una alteración común en el cáncer de colon es la hiperactivación de las proteínas Akt y PKC (la isoforma  $\beta$ , principalmente). Por lo tanto, se evaluó el estado de activación de Akt y la expresión de PKC luego de la modulación farmacológica de

HO-1. Había un aumento en los niveles de PKC  $\beta$ I en la línea celular parental HCT116 cuando HO-1 era activada. A su vez, hubo una disminución de la PKC  $\beta$ II después del tratamiento con hemina y un aumento cuando se utilizó SnPP (Figura 32A). La sobre-expresión genética de la HO-1 produjo el mismo efecto (Figura 32B) Es importante destacar que se observó un retardo en la fosforilación de Akt siguiente a la activación de HO-1 en estas células (Figura 32B). Estos resultados sugieren que las vías Akt y PKC $\beta$ I están involucradas en los efectos observados sobre la supervivencia celular.

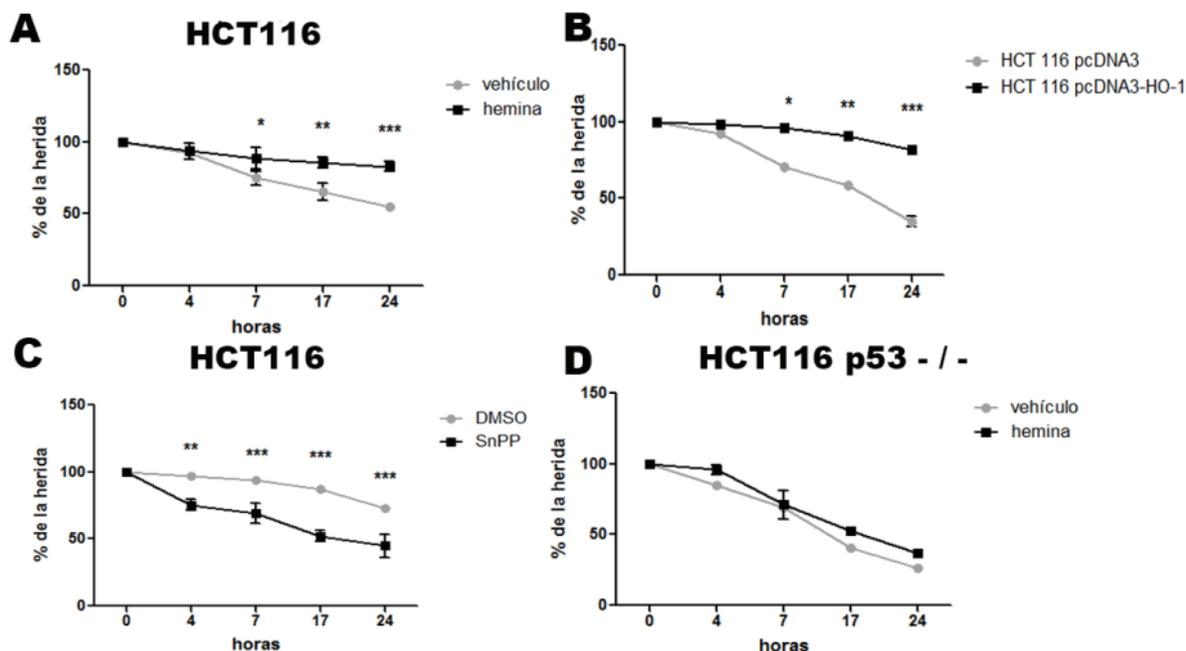


**Figura 32. HO-1 modula la fosforilación de AKT y la expresión de PKC  $\beta$ 's.** **A.** Las células HCT116 fueron tratadas por 24 h con vehículo o hemina (100  $\mu$ M), DMSO o SnPP (10  $\mu$ M). PKC  $\beta$ I aumenta con el tratamiento con hemina mientras que PKC  $\beta$  II se incrementa con el tratamiento SnPP y disminuye con hemina. **B.** Aumento de la expresión de PKC  $\beta$ I y disminución de la expresión de PKC  $\beta$ II luego de la sobre-expresión genética de HO-1 con el plásmido pEGFP-HO-1. **C.** Las células HCT116 fueron sometidas a un pre-tratamiento de 6 h con vehículo o hemina; luego fueron mantenidas por 16 h en medio libre de suero y subsecuentemente tratadas por 15 min, 30 min, 1 h , 3 h y 6 h con vehículo o hemina (100  $\mu$ M) en medio con suero. Se analizó la expresión de Akt

forsforilado por *western blot*. Los resultados fueron normalizados con Actina. Los resultados se normalizaron con Actina.

### **HO-1 modula la migración celular de la línea celular HCT116.**

Para evaluar la capacidad migratoria de las células después de la modulación de HO-1, se llevó a cabo un ensayo de la herida. Monocapas confluentes de células HCT116pcDNA3 y HCT116pcDNA3-HO-1, HCT116 p53 -/- y HCT116 tratadas con hemina/SnPP fueron sometidas a un herida. El cierre de la herida se monitoreó cada 4 durante 24 h como se describió previamente. Las células HCT116pcDNA3 y HCT116 tratadas con vehículo migraron cubriendo casi completamente la herida a las 24 h (área descubierta de la herida 34,8% y 54,87% respectivamente), mientras que en células que presentaban sobre-expresión de HO-1, ya sea en forma genética o farmacológica, un área significativa de la herida (81,84 y 82,94%) se mantuvo descubierta en el mismo período (Figura 33A y B). La inhibición de la HO-1 con SnPP produjo resultados opuestos, es decir, la herida cerró más rápido con SnPP que las células tratadas con vehículo (44,82% vs 72,58%) (Figura 33C). Estos resultados sugieren que HO-1 está implicada en la modulación de la capacidad migratoria celular. Este efecto en la activación de HO-1 no se vio cuando se trató a las células HCT116 p53 -/- con hemina (37,08 % vs 26,25%) sugiriendo que el gen supresor de tumores también estaría implicado en la migración celular (Figura 33D).

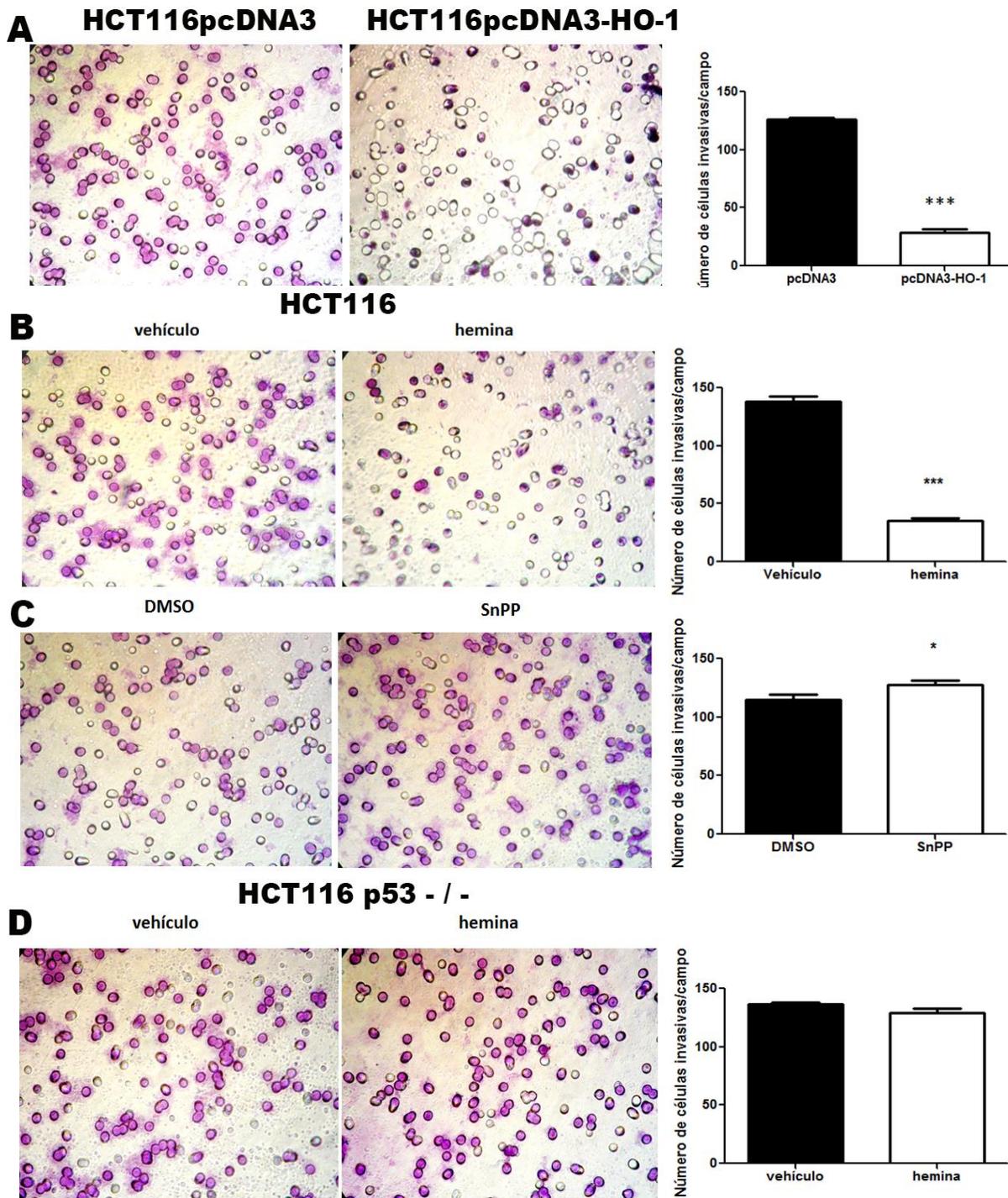


**Figura 33. HO-1 modula la migración de las células HCT116.** Monocapas confluentes de células HCT116pcDNA3, HCT116pcDNA3-HO-1, HCT116 y HCT116p53 -/- tratadas con vehículo, hemina, DMSO o SnPP fueron sometidas al ensayo de la herida. La herida fue monitoreada cada 4 horas, se midió y cuantificó el área descubierta a diferentes intervalos de tiempo y se analizó con el programa ImageJ 1.37v. Las células HCT116 tratadas con hemina **(A)** presentaron una migración celular menor que sus controles, comportamiento que se repitió en las estimuladas genéticamente **(B)**, mientras que al inhibir la actividad de la enzima con SnPP incrementa la movilidad celular **(C)**. **D.** No se observó diferencias significativas entre tratamientos con hemina y control en las células HCT116p53 -/- . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ; Two Way ANOVA.

### HO-1 modula la invasión celular de la línea celular HCT116 y HCT116pcDNA3-HO-1.

Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de HO-1 reduce la migración en la líneas celulares HCT116 y HCT116pcDNA-HO-1, que su inhibición acelera este proceso y sabiendo que el proceso de metástasis requiere tanto de un incremento

en la capacidad migratoria de las células tumorales como de su capacidad invasión se realizaron ensayos de invasión celular para estudiar los efectos de la modulación de HO-1 sobre este proceso. Con este objetivo se utilizó un ensayo que detecta la capacidad de las células para atravesar una membrana cubierta con Matrigel® tal como se describió en Materiales y Métodos. El poder invasivo de la línea celular HCT116pcDNA3-HO-1 fue significativamente menor que el de la línea HCT116pcDNA3 (Figura 34A, media y SD respectivos =  $28,95 \pm 13,95$  vs  $129,2 \pm 9,23$ ,  $***p < 0,0001$ ). El tratamiento con hemina redujo significativamente la capacidad invasiva de las células de la línea HCT116 en comparación con su control ( $35.17 \pm 14,85$  vs  $138 \pm 26,9$ ;  $***p < 0.0001$ ; Figura 34B) mientras que cuando se inhibe la actividad de la enzima con SnPP, la capacidad invasiva se ve incrementada ( $115,2 \pm 20,70$  vs  $127,9 \pm 19,10$ ;  $p = 0,0127$ ; Figura 34C). El efecto inhibitorio de la HO-1 no se evidenció en las células HCT116 p53 -/- al tratarlas con hemina (media y SD del control =  $136,6 \pm 10,10$ ; media y SD del tratamiento =  $129,4 \pm 18.42$ ;  $p = 0,0622$ ; Figura 34D).

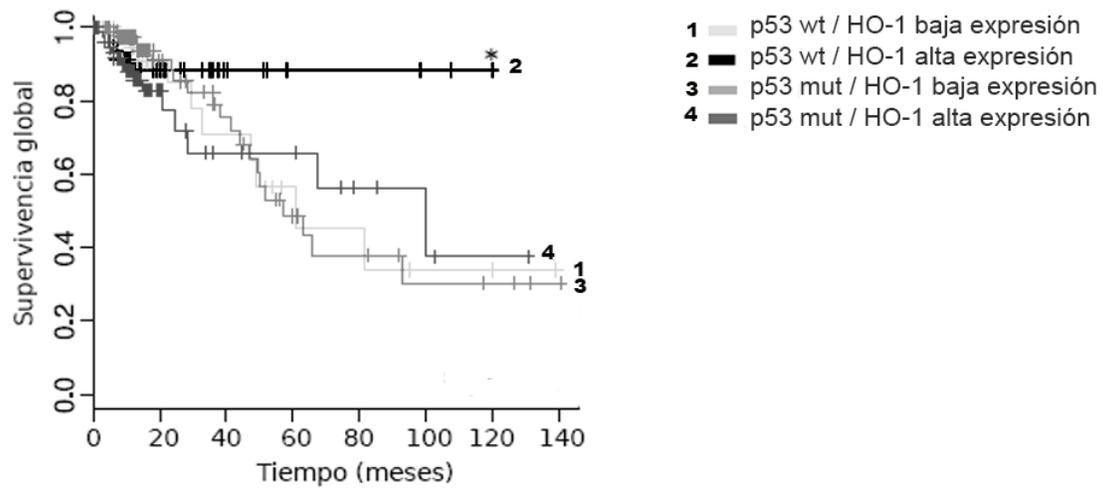


**Figura 34. Ensayo de invasión celular en células HCT116pcDNA3, HCT116pcDNA3-HO-1, HCT116 y HCT116 p53 - / -.** La invasión de las células fue cuantificada utilizando insertos recubiertos con Matrigel en las cámaras de cultivo. Las células se sembraron en las cámaras superiores de los insertos en presencia de los respectivos tratamientos en el caso que correspondía, vehículo/DMSO (control) o de hemina/SnPP (100 y 10  $\mu$ M, 16

h). Aquellas células que atravesaron el Matrigel y migraron a la cara inferior del inserto se contaron por MO. La figura muestra fotos representativas del ensayo mostrando las células que atravesaron los insertos y cuantificación de las células en la cara inferior del inserto de Matrigel. Los resultados representan la media de diez campos  $\pm$  SD. Se utilizó la prueba T en cada caso. **A.** HCT116pcDNA3 y HCT116pcDNA3-HO-1,  $***p < 0,0001$ . **B.** HCT116 tratadas con vehículo y hemina,  $***p < 0,0001$ . **C.** HCT116 tratadas con DMSO y SnPP,  $p = 0.0127$ . **D.** HCT116 p53 -/- tratadas con vehículo y hemina,  $p = 0.0622$ .

### **Los pacientes con alta expresión de HO-1 y p53 salvaje tienen una sobrevida global alta**

Los resultados hasta aquí presentados han sido obtenidos en líneas celulares y en modelos animales. Como es sabido, estos modelos experimentales, a pesar de ser válidos, pueden presentar diferencias con los tumores desarrollados en el contexto de los tejidos del cuerpo humano. Por esta razón, se procuró validar los resultados obtenidos estudiando la importancia de la HO-1 y el estado mutacional de p53 en CCR humano. Con este objetivo se evaluó la correlación entre la HO-1 y el estado mutacional de p53 con la sobrevida global de 290 pacientes con CCR. Las muestras humanas fueron obtenidas del data-set de TCGA. Se generaron cuatro grupos según la expresión de HO-1 y el estado mutacional de p53: HO-1-alta/p53wt, HO-1-baja/p53wt, HO-1-alta/p53mut y HO-1-baja/p53mut. Aquellos pacientes con alta HO-1 y p53 tipo salvaje presentaron una SG mayor que los pacientes de los otros tres grupo ( $p = 0.27$ ). Sería interesante profundizar este análisis con un seguimiento más riguroso de los pacientes y aumentando el número de muestras para confirmar la tendencia observada. Estos resultados son coincidentes con lo evidenciado en las líneas celulares y modelos animales, confirmando que la presencia de p53 está involucrada en la actividad antitumoral de la HO-1 y esta interacción prolonga la sobrevida de los pacientes (Figura 35).



**Figura 35. Curva de supervivencia de Kaplan Meier.** Pacientes con HO-1-alta/p53wt en sus tumores presentan un mayor tiempo de supervivencia global (SG) que los pacientes con niveles bajos de HO-1 o con p53 alterado (N = 290;  $p = 0,27$ ; Log Rank Test).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En carcinoma colorrectal, la principal causa de muerte es la extensión tumoral hacia otros órganos a pesar que el desarrollo de diferentes estrategias terapéuticas ha avanzado considerablemente. El estadio tumoral y el grado histológico son los indicadores pronósticos más comúnmente utilizados hoy en día, pero no siempre logran predecir con certeza el curso que tomarán los tumores malignos ni su comportamiento biológico. El comportamiento de los tumores en estadios prematuros puede no diferir al de aquellos en estadios avanzados. Incluso entre pacientes con estadios tardíos, hay quienes sucumben a la enfermedad más rápidamente que otros. Por lo tanto, es necesario caracterizar nuevos marcadores que pronostiquen la agresividad tumoral y sean utilizables como blancos terapéuticos, que resulten en una mayor sobrevida de los pacientes con CCR.

Son necesarias al menos siete alteraciones genéticas para que se desarrolle el CCR a través de la secuencia adenoma-carcinoma (Fearon y Vogelstein, 1990), dentro de las cuales, es de particular importancia, como se ha demostrado en el presente trabajo, la mutación o pérdida de función del gen p53 en el cromosoma 17. Estas alteraciones genéticas podrían influir en el comportamiento de otras moléculas, como en el caso de HO-1, quien a su vez induce y/o suprime la expresión de determinadas moléculas. Además se produce un cambio en el patrón de expresión de la misma a medida que la secuencia va progresando, lo cual le confiere a estas células un fenotipo biológico particular.

Shi y colaboradores (1984) sugirieron que la mucosa normal adyacente al tumor sería una área pre-neoplásica. Esta mucosa, a diferencia del tejido normal, podría ser una zona en donde se reflejan las alteraciones histoquímicas y morfológicas que están ocurriendo en el carcinoma (Riddell y Levin, 1977).

Han y colaboradores (2009) explican esta diferencia, mediante alteraciones genéticas que ocurren en los distintos tejidos durante el desarrollo de la enfermedad. Según este reporte, la mucosa cancerosa es diferente de la mucosa

normal, difieren en aproximadamente el 20% de los genes (769/3944, 363 de ellos sobre- y 406 sub-expresados). Las diferencias entre la mucosa normal y mucosa peri-cancerosa ubicada a 5 cm del carcinoma son relativamente pequeñas (5,8%, 250/3944, 46 sobre- y 184 sub-expresados). Sin embargo, habría que considerar a esta zona como diferente al tejido normal. Los genes expresados diferencialmente se asociaron con varios tipos funcionales que incluyen genes relacionados con el tumor, genes que regulan la proliferación celular y la apoptosis, genes de control transcripcional, y genes asociados a la construcción y degradación de la matriz extracelular. Las células ubicadas en esta zona, también tienen diferentes longitudes de telómeros comparados con los hallados en la mucosa normal (Rampazzo et al, 2010). Estos hallazgos reforzarían el concepto de que la mucosa normal adyacente al carcinoma tendría características histológicas compartidas entre el tejido normal y el tejido tumoral. Teniendo en cuenta estas teorías y dado que, en el presente trabajo las comparaciones fueron hechas entre tejido tumoral y tejido histológicamente normal adyacente al tumor, las diferencias aquí encontradas podrían diferir respecto las diferencias existentes entre el carcinoma y el tejido normal.

Se ha intentado realizar un estudio integral de la influencia de la HO-1 en el carcinoma colorrectal. Para ello, se ha trabajado en los tres sistemas experimentales habitualmente utilizados en los estudios de biología del cáncer. Se ha investigado el rol de la HO-1 realizando experimentos con líneas celulares derivadas de CCR humanos, con modelos animales y con biopsias humanas.

Se ha demostrado que HO-1 está sobre-expresada en el epitelio tumoral de biopsias invasivas de CCR en comparación con su tejido adyacente no maligno. Estos resultados, están de acuerdo con los obtenidos por nuestro grupo en carcinoma de células escamosas (Gandini et al, 2012), glioma (Gandini et al, 2014) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Degese et al, 2012), donde se encontró que la HO-1 aumentaba junto con la progresión del tumor. Dado que la inducción de HO-1 es un proceso de defensa celular fundamental contra el estrés oxidativo y otras agresiones ambientales, su aumento en las células tumorales

puede proporcionar la primera línea de defensa celular contra estas injurias. Esto podría explicar el aumento de la expresión de HO-1 observado en gran variedad de tumores. La sobre expresión de HO-1, también ha sido demostrada en linfoma (Schacter y Kurz, 1982), carcinoma de próstata (Sacca et al, 2007), tumores cerebrales (Deininger et al, 2000; Hara et al, 1996), carcinoma renal (Goodman et al, 1997), hepatoma (Doi et al, 1999), melanoma (Torisu-Itakura et al, 2000), sarcoma de Kaposi (McAllister et al, 2004) cáncer de páncreas (Berberat et al, 2005) y en leucemia mieloide crónica (Mayerhofer et al, 2004).

Respecto al CCR humano, un informe anterior mostró tinción apical en las criptas del epitelio normal del colon y mayores tasas de expresión en CCR que en las muestras adenoma de colon (Becker et al, 2007) similar a lo presentado en este trabajo. Dos reportes recientes, también mostraron altos niveles de expresión en los tumores (Kang et al, 2012; Yin et al, 2014), pero contrariamente a estos resultados, Yin y colaboradores informaron una tinción menor en los tumores pobremente diferenciados. Hasta la fecha, no hay informes que hayan seguido con el estudio de la expresión de HO-1 en CCR humanos. En cambio, sí hay varios estudios que tratan acerca de la función de HO-1 en la fisiología intestinal normal y en enfermedades intestinales inflamatorias. Curiosamente, la expresión de HO-1 está por lo general aumentada en la inflamación y lesiones gastrointestinales (Barton et al, 2003), procesos asociados con la progresión del cáncer; esta regulación se muestra en úlceras gástricas (Guo et al, 2002), colitis (Wang et al, 2001), enteritis por radiación (Giris et al, 2006) enfermedad inflamatoria del intestino (Paul et al, 2005) tanto en pacientes como en modelos animales. Se ha demostrado que esta regulación de HO-1 desempeñan un papel en la protección de la inflamación y en la lesión por estrés oxidativo en el tracto gastrointestinal (Zhu et al, 2010), un papel que pueden inhibir la progresión del tumor CCR y/o puede mejorar la evolución del paciente. De acuerdo con esto, también se ha demostrado aquí, la expresión de HO-1 en los tumores se asocia con un aumento de la supervivencia global de los pacientes que padecen CCR. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos de expresión de HO-1 en CCR, donde fue encontrada una correlación entre la positividad de HO-1 y una mejor supervivencia

a largo plazo (Becker et al, 2007). Sin embargo, estos hallazgos son opuestos a los encontrados por Seo y colaboradores (2015) quienes plantean que HO-1 aumenta la progresión tumoral y la metástasis de las células de CCR mediante la inhibición de la inmunidad antitumoral. Este rol protumoral fue encontrado en la mayoría de los tipos de tumores analizados (Was et al, 2010; Chau, 2015). Las excepciones a este papel protumoral de HO-1 han sido detallados por los resultados de Becker y colaboradores en CCR y por las observaciones de los carcinomas de células escamosas lengua (Yanagawa et al, 2005), tumores mamarios (Hill et al, 2005 y observaciones no publicadas de este laboratorio) y en cáncer de próstata (Gueron et al, 2009; Elguero et al, 2012; Ferrando et al, 2013).

Cabe destacar, que al analizar los tumores, se detectaron amplias zonas de necrosis. La hipoxia y la alcalinización intracelular encontradas habitualmente en los tumores sólidos podrían inducir un aumento de la expresión de CEA. Un análisis de la secuencia promotora de este antígeno informó que presenta un sitio de unión para el factor de transcripción HIF-1 (factor de hipoxia inducible tipo 1) el cual, en condiciones de hipoxia, se uniría al promotor del CEA aumentando la expresión del mismo (Spruessel et al, 2004; Kokkonen et al, 2007; Lee et al, 2011). Adicionalmente, existen reportes que describen observaciones donde las células que expresan la molécula de adhesión celular tipo 1 relacionada con CEA (CEACAM1) tienen la propiedad de estimular la proliferación, la quimiotaxis y la formación de tubos similares a los capilares de la microvasculatura humana; el aumento de la expresión de esta molécula podría estar dada por VEGF (Kim et al, 1999; Ergün et al, 2000; Chen et al, 2006). La unión a su receptor (CEA-R) llevaría a la producción de citoquinas y al aumento de la expresión de moléculas de adhesión endotelial, tales como el FNT- $\alpha$ , lo que finalmente facilitaría la supervivencia de la metástasis. Es interesante recordar que se detectó una correlación positiva entre alta expresión de la enzima y niveles sanguíneos preoperatorios de CEA normales.

Otro parámetro histopatológico, con el cual se asociaron altos niveles de la enzima, fue el estado no mutado de K-ras. La familia de los genes *ras* (H-ras, N-

ras y K-ras) es uno de los grupos de oncogenes alterados con mayor frecuencia en las neoplasias humanas. El oncogén K-ras se localiza en el cromosoma 12 y participa en señalización de las vías PI3K/PTEN/AKT y RAF/MEK/ERK7 (Levidou et al, 2012). Makrodouli y colaboradores (2011) comentan en su publicación que las proteínas codificadas por estos genes constituyen una estructura proteica de 21Kd (p21) que actúa en la vía de transducción de señales de crecimiento y diferenciación celular. La mutación de este gen, es el evento genético más comúnmente observado en el desarrollo de tumores (pulmón 30%, colon 40%, páncreas 80%, tiroides 55%) (Jancik et, 2010). En el cáncer colorrectal se ha encontrado mutación del gen K-ras entre 30 y 50% de los casos (Neumann et al, 2009; Knijn et al, 2011) y se vio que su estado de mutación era determinante para la respuesta de algunas terapias monoclonales, siendo de gran utilidad clínica. Ciertos estudios han demostrado que algunos tipos específicos de mutación de K-ras tienen relación con la sobrevida (Winder et al, 2009; Imamura et al 2012). Estos estudios justificarían la correlación positiva evidenciada entre la alta expresión de HO-1 y un fenotipo salvaje de K-ras, que resulta en un mejor pronóstico y esperanza de vida.

Con el fin de demostrar que HO-1 aumenta con la progresión tumoral, también se evaluó su expresión en un modelo animal de carcinogénesis química en rata y en un modelo murino de CCR donde se implantaron células que presentaban la HO-1 sobreexpresada en forma estable. Se observó una sobrerregulación de HO-1 así como un aumento en la incidencia de localización nuclear durante la progresión del tumor. Se pudo detectar una disminución del volumen en aquellos tumores que sobreexpresaban HO-1. La evaluación del índice nuclear (IN), es decir del tamaño y la forma de los núcleos, y del índice mitótico (IM), por ende el porcentaje de las células tumorales que están en proceso de multiplicarse, ofrece la posibilidad de evaluar el nivel de diseminación tumoral. Los tumores con un IM e IN bajo crecen y se diseminan más lentamente que los cánceres con un IN e IM alto. Este hecho, se pudo comprobar en el modelo animal murino, donde se observó que los tumores que tenían alta expresión de HO-1 y localización nuclear presentaban menor cantidad de figuras mitóticas. No hubo diferencias en el IN, que fue elevado

para todos los tumores. Este último índice ha sido ampliamente estudiado en varias localizaciones tumorales tales como mama (Yang et al, 2001), vejiga (Konety et al, 2000) y riñón (Ficarra et al, 2001) pero en el caso del CCR la bibliografía es escasa.

La expresión nuclear también se observó en muestras humanas. Estos resultados son concordantes con las observaciones de Yin y colaboradores (2014), donde se observó un aumento de HO-1 nuclear en etapas avanzadas del tumor. La localización nuclear también se informó por nuestro grupo en muestras humanas y en un modelo animal de carcinoma de células escamosas (Gandini et al, 2012) en adición a informes previos que demuestran un aumento de la tinción nuclear de HO-1 cuando displasias epiteliales orales progresan de moderada a grave (Lee et al, 2008). Asimismo, se obtuvieron resultados similares en el cáncer de próstata, donde se observó que la expresión nuclear de HO-1 era inferior en los tejidos adyacentes no malignos que en los de carcinoma de próstata (Sacca et al, 2007). Además, en apoyo al rol de la HO-1 en la progresión tumoral cuando se encuentra en núcleo, un informe reciente demostró que el humo del cigarrillo induce la translocación nuclear de HO-1, y esto promueve la localización vascular y la secreción de factor de crecimiento endotelial, lo que favorece la progresión del tumor de próstata (Birrane et al, 2013). Aunque esta novedosa localización nuclear de HO-1 ha sido demostrada en algunos tejidos, la importancia de su rol no ha sido completamente dilucidada. En este sentido, se postuló que la forma nuclear de HO-1 puede incrementar la expresión de genes que promueven la citoprotección contra el estrés oxidativo (Lin et al, 2007). Hay pruebas que demuestran que la localización nuclear de HO-1 podría tener un rol fisiológico independientemente de su actividad enzimática. Por ejemplo, la transfección de genes que promueven la actividad de HO-1 en células mutantes que carecen de esta proteína protege a las células contra el estrés oxidativo (Busserolles et al, 2006). Debido a que la estructura HO-1 no muestra sitios de unión al ADN parece que esta proteína no es un típico factor de transcripción (Lin et al, 2007). Sin embargo, la HO-1 actúa como una proteína coreguladora transcripcional capaz de

modular factores de transcripción, justificando su localización para este comportamiento.

Como ya se ha dicho, la mayor parte de la literatura muestra un papel protumoral de HO-1 (Banerjee et al, 2012) con algunas excepciones ya mencionadas. Desde que se observó, en este trabajo de tesis, una asociación de la HO-1 con los tiempos de supervivencia más largos de los pacientes, se planteó la hipótesis que la expresión de la HO-1, en células de CCR, podría inhibir la supervivencia celular.

Con el objetivo de demostrar esta hipótesis, se comenzó a trabajar con cultivos celulares, donde la actividad de la HO-1 fue inhibida con SnPP e inducida con la droga hemina. La hemina es un reconocido inductor de la expresión y actividad de la HO-1 (Shibahara et al, 1979). Se realizó un ensayo de toxicidad de las concentraciones y las condiciones bajo las cuales eran realizados los experimentos, para confirmar que los resultados observados se debían a la sobreexpresión de la enzima y no a efectos secundarios de la hemina. En paralelo, se reproducían todos los ensayos modulando la enzima genéticamente mediante transfección transitoria del plásmido pEGFP-HO-1; además, se generó la línea HCT116pcDNA3-HO-1, por transfección estable del plásmido pcDNA3-HO-1, para confirmar que la expresión de HO-1, es *per se*, responsable de la modulación de los procesos celulares observados. De esta manera, se demostró, en dos líneas celulares, que la activación de HO-1 disminuye la supervivencia celular a través de la detención del ciclo celular. Es importante destacar que, la proteína supresora de tumores p53 es necesaria para estos efectos, ya que la reducción de la supervivencia celular, por parte de HO-1, se ve bloqueada en la línea celular HCT116 que carece de p53 y en la línea HT29, en la cual p53 se encuentra mutado, efecto que se revierte cuando se reintroduce el gen p53. La misma observación fue hecha por Zambetti (1992). En su trabajo, sugiere una posible función de la proteína p53 de tipo salvaje como un transactivador transcripcional de genes específicos. En principio, la secuencia primaria de la proteína se asemeja a algunos factores de transcripción. Tiene un dominio ácido amino-terminal, cuyos primeros 75 aminoácidos, que se unen a un dominio de unión al

ADN, promueven positivamente la expresión de genes en levaduras y mamíferos. El dominio carboxi-terminal de la proteína p53 es bastante básico. La proteína de tipo salvaje se une al ADN, mientras que las formas mutantes de la proteína p53 se unen menos o bien no se unen en absoluto a secuencias de ADN no específicos. Recientemente, se ha demostrado que las proteínas p53 de tipo salvaje se unen al ADN respetando una secuencia específica. En un estudio, una secuencia con motivo TGCCT (N)<sub>5-12</sub>, TGCCT se detectó como un importante elemento de reconocimiento del ADN (Kern et al 1991b). En un segundo estudio de un dominio rico en GC cerca del origen de replicación del ADN de SV40 fue identificado como una secuencia específica de ADN reconocida por la proteína p53 de tipo salvaje (Bargonetti et al, 1991). Estas dos secuencias de nucleótidos no tienen extensa homología o similitudes fácilmente reconocibles. Iacopetta (2003) complementa esta información en su reporte, donde comenta que la frecuencia de mutación de p53 en CCR se estima en un 45% (1186/2659). Información suministrada por la base de datos UMD-p53 sobre 1517 mutaciones de p53 indica que el 80% son transiciones de GC a AT predominantemente en los dinucleótidos CpG. Estas mutaciones se cree que surgen por procesos endógenos relacionados con la desaminación de 5-metilcitosina. Las mutaciones en cinco codones hotspot (175, 245, 248, 273, y 282) representan aproximadamente 43% de todas las mutaciones de p53 en CCR y tres de estos codones (175, 248 y 273) contienen dinucleótidos CpG.

Los resultados obtenidos en cultivo, fueron confirmados *in vivo*. En los modelos murinos trasplantados con células HCT116 y HCT116 p53 *-/-*, utilizados en esta tesis, se ha demostrado que la hemina induce la sobreexpresión de HO-1 y produce una translocación de la enzima a núcleo en ambos modelos animales, tal como se vio en los modelos animales anteriores; sin embargo, HO-1 sólo disminuye la carga tumoral en aquellos tumores donde p53 se encuentra en estado salvaje, resultando también en un fenotipo menos agresivo. Estos resultados son coincidentes con el análisis observado en el trabajo publicado por Rosas Marroquín y Torres (1999), quienes al determinar la presencia de proteína p53 mutada en pacientes con cáncer colorrectal, y correlacionarla con el tamaño

del tumor y grado de infiltración, hallaron que los resultados eran directamente proporcionales empezando de un 25% en Dukes A hasta 100% de mutación en Dukes D, afirmando que existe dependencia entre la presencia de la proteína p53 mutada y el tamaño promedio del tumor. Asimismo, el 100% de los casos cáncer de colon sumamente invasivos (Dukes D) expresaron la proteína p53 mutada, los carcinomas Dukes B y Dukes C expresaron positividad ambos en un 56% y en carcinomas poco invasivos (Dukes A) solamente expresan el 25%. Nos podemos dar cuenta según estos resultados, que a mayor agresividad mayor expresión de proteína p53 mutada.

Al estudiar los mecanismos por los cuales la acción conjunta de HO-1 y p53 en estado salvaje podrían estar disminuyendo la carga tumoral *in vivo*, se observó que además de disminuir la proliferación, también estimulaba la apoptosis y la actividad de las caspasas-3. En oposición a estos resultados, estudios previos de otros laboratorios mostraron una actividad anti-apoptótica de HO-1 en la línea celular Caco-2, que posee p53 mutado (Busserolles et al, 2006); o bien que la actividad de HO-1 es independiente del estado mutacional del gen supresor de tumores en CCR (Liu et al, 2004).

Cabe destacar que al efectuar el análisis de supervivencia de humanos en función de la expresión de HO-1 y el estatus mutacional de p53, los resultados obtenidos fueron los esperados en base a los descriptos anteriormente en las líneas celulares y los modelos animales, donde se observó que la sobreexpresión de HO-1 produce efectos antitumorales cuando p53 se encuentra en estado salvaje. Se observó una tendencia clara, altos niveles de HO-1 y la presencia conjunta de p53, en estado salvaje, producen un aumento de la sobrevida de los pacientes con respecto a aquellos que presentaban p53 mutado y/o bajos niveles de HO-1. Estas observaciones son coincidentes con estudios realizados en CCR que sugieren que el conocimiento del estado de p53 de un paciente, tanto con respecto a la presencia de mutaciones puntuales y a la naturaleza específica de la lesión, puede ser necesaria para predecir con precisión tanto el curso de la enfermedad como la respuesta de la enfermedad luego de la intervención quirúrgica, especialmente las

terapias basadas en la inducción de la apoptosis en la célula neoplásica (Goh et al, 1995). Molina-Vila y colaboradores (2014) también observaron que mutaciones sin interrupciones de p53 se asocian con una menor supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado. Iacopetta (2003) publicó un informe que resume 25 estudios en CCR donde se buscó la existencia de una asociación de un p53 mutado con la supervivencia de pacientes, 14 de ellos encontraron una asociación con una peor supervivencia, 8 no encontraron ninguna asociación, y 3 hallaron una asociación con un mejor resultado. Varios aspectos deben ser considerados en la interpretación de estos resultados. La primera se refiere al poder estadístico del tamaño muestral de los estudios para la detección de una diferencia entre los grupos de pacientes con p53 mutado y tipo salvaje. Según Iacopetta, se requiere un N=800 con el fin de detectar una diferencia del 10% en la supervivencia. Se debe tener en cuenta también, la localización del tumor, el estadio de la enfermedad. No menos importante es el estilo de mutación, debido a las diferentes especificidades antigénicas, los diversos anticuerpos p53 utilizados también podría identificar subgrupos tumorales con diferente pronóstico. Existe alguna evidencia de que las diferentes mutaciones de p53 están asociados con diferentes propiedades clínicas incluyendo el pronóstico y la respuesta a la terapia, aunque aún se requieren más estudios para establecer esto.

Los carcinomas se caracterizan, en principio, por aumento en la proliferación de células epiteliales. La aparición subsecuente de invasividad ocurre al inicio de la etapa final del proceso que finalmente lleva a la diseminación metastásica (Jaggi et al, 2005). Dado que se comprobó la influencia de los efectos de HO-1 y p53 en su estado salvaje en los procesos más tempranos del desarrollo tumoral, se prosiguió con el estudio de los efectos de invasividad y migración de la HO-1. Se comprobó que al sobreexpresarla de manera genética y farmacológica, las células tumorales que presentaban p53 *wild type*, perdían poder invasivo y migratorio. Dicho efecto se vio abolido por la ausencia de p53 y por la inhibición de la actividad de la enzima con SnPP. Estudios preliminares, no mostrados, sugieren que estaría implicada la metaloproteasa-9. Esta gelatinasa está comprometida con la metástasis y la angiogénesis en el CCR (Tutton et al, 2003). En relación a esto,

hay evidencia que indica que HO-1 reduce los niveles de la metaloproteasa-9 (Gueron et al, 2009). También resultados aún no publicados por este laboratorio y observaciones de Lin y colaboradores (2008) en cáncer de mama son coincidentes con lo aquí detectado. No obstante, en vejiga (Miyata et al, 2014) y glioma (Lu et al, 2012) se detectó que la HO-1 estimula estos procesos.

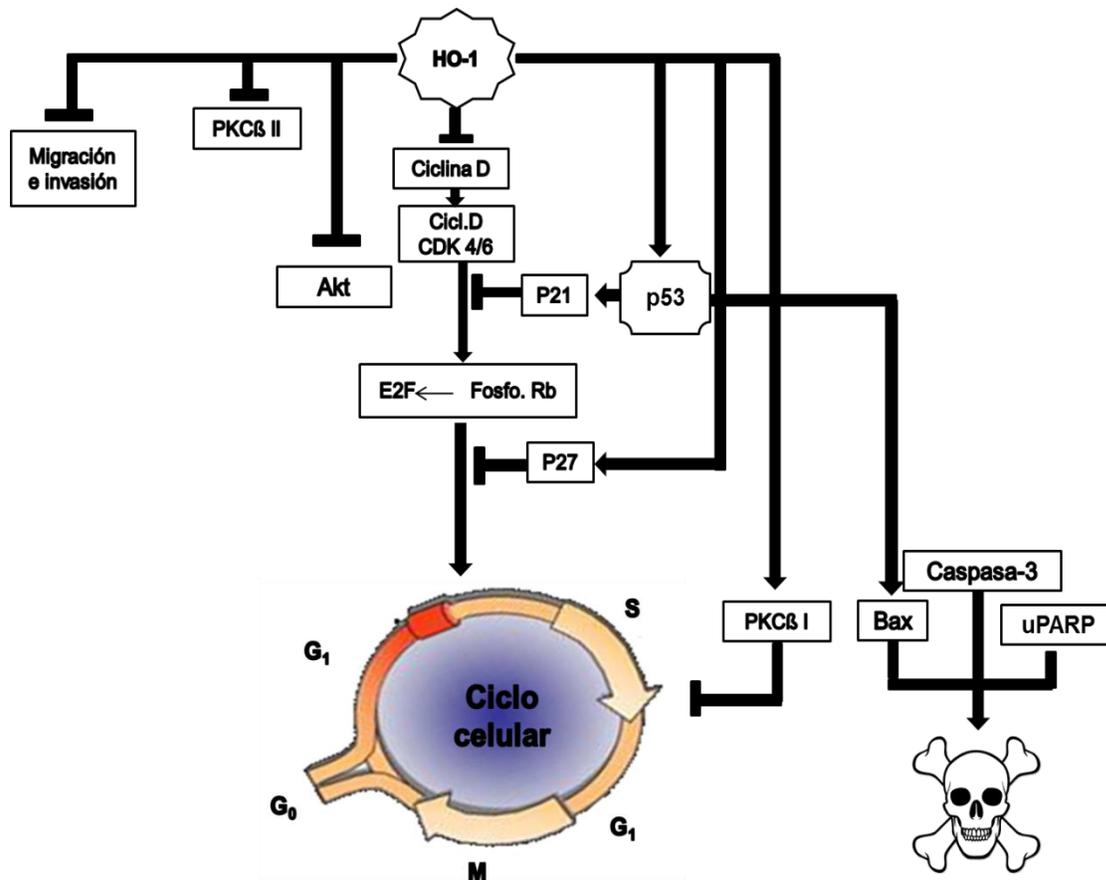
En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de HO-1 disminuye la viabilidad en CCR a través de la regulación de p53 de tipo salvaje. El gen supresor de tumor p53 está mutado en más del 50% de los tumores humanos y desempeña un papel importante en la respuesta al estrés genotóxico e hipoxia. Las respuestas contradictorias acerca del efecto de la activación de HO-1 observadas en diferentes células tumorales podrían explicarse por el diferente estado de p53. Sin embargo, la relación entre la HO-1 y p53 todavía no está claro; hay algunos informes que muestran que p53 induce HO-1, y otros que demuestran que HO-1 está corriente arriba de p53 en la cadena de señalización. Por ejemplo, en los órganos linfoides de ratones irradiados con rayos se demostró que HO-1 era un gen blanco directo de p53 (Meiller et al, 2007). También se demostró un papel de p53 en la promoción de la supervivencia celular a través de la activación de HO-1 (Nam y Sabapathy, 2011). Por otro lado, Lee y colaboradores (2008) han demostrado que la actividad de HO-1 está implicada en la regulación de la expresión de p53 en una línea de células epitelial del pigmentario de la retina humana y Kim y colaboradores (2014) observaron que HO-1 es necesaria para la regulación de p53 inducida por 15d-PGJ2 en células de cáncer de mama. Es importante destacar que, en células no pequeñas de carcinoma de pulmón, la HO-1 sobre-expresó p53 y esto fue acompañado por una reducción en la proliferación, migración y potencial angiogénico (Skrzypek et al, 2013). Se deben realizar investigaciones adicionales con el fin de establecer a p53 de tipo salvaje como el responsable de efectos que produce HO-1 sobre la supervivencia celular en CCR.

Parte de los efectos observados cuando se activa HO-1 pueden ser secundarios a la modulación de las vías de Akt y PKC  $\beta$ . El papel de la PKC  $\beta$  es controversial y varía en diferentes líneas celulares. De acuerdo con los resultados obtenidos por

Choi y colaboradores (1990) PKC  $\beta$ I se asocia con tumorigenicidad reducida en cáncer colorrectal, mientras que la activación de PKC, isoforma  $\beta$ II, juega un papel directo en el aumento de la proliferación de células de este tipo de cáncer (Sauma et al, 1996). El papel de la vía de Akt en el CCR está bien estudiado y modula tanto la supervivencia celular como los procesos de migración (Agarwal et al, 2013).

En resumen, estos resultados sugieren que HO-1 juega un rol destacado en la señalización celular, en la regulación de la viabilidad, de la migración e invasión, disminuyendo estos procesos en CCR, a pesar de su actividad citoprotectora y antiapoptótica en tejido normal. Se aportó pruebas sobre la sobre-expresión de HO-1 en CCR. Este aumento de la regulación se asocia con un aumento en el tiempo de supervivencia global de los pacientes. Se pudo demostrar la localización nuclear y su asociación con p53, posiblemente desarrollando un rol como co-factor transcripcional además del ya conocido rol enzimático protagonizado en el citoplasma; no obstante es necesario realizar más estudios para comprender mejor qué capacidades tiene la molécula en este nuevo sitio. Cabe resaltar la importancia y reproducibilidad de este estudio, al recopilar resultados obtenidos con modelos celulares, animales y muestras humanas teniendo en cuenta que la regulación de la expresión de HO-1 es diferente según el entorno celular. En conjunto, estos resultados apuntan a un papel anti-tumoral de HO-1 mediado por p53 de tipo salvaje en CCR.

Finalmente, esta tesis pretendió aportar pruebas y conocimiento de los eventos moleculares (Figura 36) asociados al CCR y de esta manera poder aumentar el desarrollo de biomarcadores que pudiesen resultar en mejores estrategias para la prevención de la enfermedad.



**Figura 36. Esquema resumen de los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de HO-1.** El aumento de los niveles proteicos de HO-1 disminuye la viabilidad celular, entendiéndose como tal a las alteraciones en el número de células de una población celular. Este efecto es logrado tanto por regulación del ciclo celular (a través de un arresto celular en la fase sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo células, como consecuencia de un aumento en los niveles de expresión de p53, p21 y p27, además de la disminución de los niveles de la ciclina D) como por inducción de apoptosis temprana, debido a un aumento de la actividad de caspasa-3 y aumento en los niveles de las proteínas pro-apoptóticas Bax y uPARP. Paralelamente se ven moduladas las vías de Akt y PKCβ. Además, su aumento de expresión disminuye los procesos de migración e invasión. Cabe resaltar la importancia de un p53 wild type, para que estos efectos anti-tumorales de HO-1, ocurran con éxito.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal E, Brattain, MG, Chowdhury,S. 2013. Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer. *Cell Signal* 25: 1711-1719.
- Astort F. Mecanismos involucrados en la inducción del gen de HO-1 en células adrenales. Efecto de ACTH, NO y LPS. Tesis doctoral dirigida por Cymeryng CB. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 2012.
- Astudillo A, 2004. Clasificación y caracterización biológica de los tumores neuroendocrinos del tracto gastrointestinal. *Oncología (Barc.)*. 27(4): 51-56.
- Banerjee P, Basu A, Wegiel B, Otterbein LE, Mizumura K, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Choi AM, Pal S, 2012. Heme oxygenase-1 promotes survival of renal cancer cells through modulation of apoptosis- and autophagy-regulating molecules. *J Biol Chem*. 287(38): 32113-32123.
- Bargonetti J, Friedman PN, Kern SE, Vogelstein B, Prives C, 1991. Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell*. 65: 1083-1091.
- Barton SG, Rampton DS, Winrow VR, Domizio P, Feakins, RM, 2003. Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress Chaperones*. 8(4): 329-334.
- Becker JC, Fukui H, Imai Y, Sekikawa A, Kimura T, Yamagishi H, Yoshitake N, Pohle T, Domschke W, Fujimori T, 2007. Colonic expression of heme

oxygenase-1 is associated with a better long-term survival in patients with colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol.* 42(7): 852-858.

Benavides F y Guenet JL, 2000. Modelos murinos de enfermedades humanas. *Medicina.* 61: 215-231.

Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbinas A, Giese T, Giese N, Künzli B, Autschbach F, Meuer S, Büchler MW, Friess H, 2005. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res.* 11(10): 3790-3798.

Birrane G, Li H, Yang S, Tachado SD, Seng S, 2013. Cigarette smoke induces nuclear translocation of heme oxygenase 1 (HO-1) in prostate cancer cells: nuclear HO-1 promotes vascular endothelial growth factor secretion. *Int J Oncol.* 42(6): 1919-1928.

Boschetto P, Zeni E, Mazzetti L, Miotto D, Lo Cascio N, Maestrelli P, Marian E, Querzoli P, Pedriali M, Murer B, De Rosa E, Fabbri LM, Mapp CE, 2008. Decreased heme-oxygenase (HO)-1 in the macrophages of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 59(2): 192-197.

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.

Britannica Oline. Encyclopedia Britannica. Accessed 13-17 June. 2005

Busserolles J, Megías J, Terencio MC, Alcaraz MJ, 2006. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(9): 1510-1517.

- Castiglioni A. A History of Medicine. 1<sup>st</sup> ed. New York: Knoppe AA, 1941. 1013.  
ISBN 10: 0876681038/ISBN 13: 9780876681039.
- Cerda J, Vera C, Rada1 G, 2013. Odds ratio: aspectos teóricos y prácticos. Rev. méd. 141(10): 1329-1335.
- Chen JC, Huang KC, Lin WW, 2006. HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK, p38 MAPK and protein kinase G pathways. Cell Signal. 18(1): 32-39.
- Chau L, 2015. Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy. Journal of Biomedical Science. 22: 22
- Chen WJ, Chen HW, Yu SL, Huang CH, Wang TD, Chen JJ, Chien CT, Chen HY, Yang PC, Lee YT, 2005. Gene expression profiles in hypoxic preconditioning using cDNA microarray analysis: altered expression of an angiogenic factor, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. Shock. 24(2): 124-131.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR, 2004. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. Science. 303(5660): 1010-1014.
- Choi PM, Tchou-Wong KM, Weinstein IB, 1990. Overexpression of PKC in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. Mol Cell Biol. 10(9): 4650-4657.
- Clark JE, Green CJ, Motterlini R, 1997. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway in keratinocyte proliferation. Biochem Biophys Res Commun. 18;241(2): 215-220.

- Compton CC, Greene FL, 2004. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin.* 54(6): 295-308.
- Converso DP, Taille C, Carreras MC, Jaitovich A, Poderoso JJ, Boczkowski J, 2006. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J.* 20(8): 1236-1238.
- Crespo Sanjuán J. Implicación del estrés oxidativo, alimentación, estilo de vida y variantes polimórficas del gen de apolipoproteína D en pacientes con pólipos intestinales y con adenocarcinoma esporádico de colon. Tesis doctoral dirigida por Bustamante Bustamante MR, Garrote Adrados JA. Departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular. 2012. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/2622>.
- Dang TN, Bishop GM, Dringen R, Robinson SR, 2011. The metabolism and toxicity of heme in astrocytes. *Glia.* 59(10): 1540-1550.
- Degese MS, Mendizabal JE, Gandini NA, Gutkind JS, Molinolo A, Hewitt SM, Curino AC, Coso OA, Facchinetti, MM, 2012. Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data. *Lung Cancer.* 77(1): 168-75.
- Deininger MH, Meyermann R, Trautmann K, Duffner F, Grote EH, Wickboldt J, Schluesener HJ, 2000. Heme oxygenase (HO-1) expressing macrophages/microglial cells accumulate in perinecrotic areas of rat and human gliomas. *Brain Res.* 882(1-2): 1-8.
- Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, Shibahara S, Ogawa M, Maeda H, 1999. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in

experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer*. 80(12): 1945-1954.

Elguero B, Gueron G, Giudice J, Toscani MA, De Luca P, Zalazar F, Coluccio-Leskow F, Meiss R, Navone N, De Siervi A, Vazquez E, 2012. Unveiling the association of STAT3 and HO-1 in prostate cancer: role beyond heme degradation. *Neoplasia*. 14(11): 1043-1056.

Ergün S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C, 2000. CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell*. 5(2): 311-320.

Essick EE y Sam F, 2010. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 3(3): 168-77.

Fearon y Vogelstein, 1990. A genetic model of colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61(5): 759-767.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F, 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM, 2010. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

- Ferrando M, Wan X, Meiss R, Yang J, De Siervi A, Navone N, Vazquez E, 2013. Heme oxygenase-1 (HO-1) expression in prostate cancer cells modulates the oxidative response in bone cells. *PLoS One*. 8(11): e80315.
- Ficarra V, Righetti R, Martignoni G, D'Amico A, Pilloni S, Rubilotta E, Malossini G, Mobilio G, 2001. Prognostic value of renal cell carcinoma nuclear grading: multivariate analysis of 333 cases. *Urol Int*. 67(2): 130-134.
- Fidler IJ, Yano S, Zhang RD, Fujimaki T, Bucana CD, 2002. The Seed and Soil Hypothesis: Vascularization and Brain. *The Lancet Oncology Metastasis*. 3(1): 53-57.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP, 1986. A Human DNA segment with Properties of the Gene that Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma. *Nature*. 323(1986): 643-646.
- Galbraith R, 1999. Heme oxygenase: who needs it?. *Proc Soc Exp Biol Med* 222(3): 299-305.
- Gandini NA, Fermento ME, Salomón DG, Obiol DJ, Andrés NC, Zenklusen JC, Arevalo J, Blasco J, López Romero A, Facchinetti MM, Curino AC, 2014. Heme oxygenase-1 expression in human gliomas and its correlation with poor prognosis in patients with astrocytoma. *Tumor Biol*. 35(3): 2803-2815.
- Gandini, NA, Fermento MA, Salomón D, Blasco J, Patel V, Gutkind JS, Molinolo AA, Facchinetti MM, Curino AC, 2012. Nuclear Localization of Heme Oxygenase-1 is Associated with Tumor Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Exp Mol Pathol*. 93(2): 237-245.

- García Triana BE, Saldaña Bernabeu A, Saldaña García L, 2013. El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Rev haban cienc méd.* 12(2): 187-196.
- Gascón P, 2009. Futuro de los marcadores moleculares en cáncer: hacia un tratamiento personalizado. *Medicina Clínica.* 132(14): 549-550.
- Gil González GA, Hernández Pérez A, González Rodríguez D, Hernández Fernández DM, Castañeda Muñoz A, 2009. Tumor del Estroma Gastrointestinal (GIST). Presentación de un caso. *Rev méd electrón[Seriada en línea].* 31(1). Disponible en URL: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202009/vol1%202009/tema17.htm>
- Giriş M, Erbil Y, Oztezcan S, Olgaç V, Barbaros U, Deveci U, Kirgiz B, Uysal M, Toker GA, 2006. The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on radiation-induced intestinal damage: the effect of heme oxygenase-1 on radiation enteritis. *Am J Surg.* 191(4): 503- 509.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J, 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 72(11): 1493-505.
- Goh HS, Yao J, Smith DR, 1995. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 55(22): 5217-5221.
- Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG, 1997. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med.* 214(1): 54-61.

- Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT, 1984. Landmark Perspective: Nitrogen Mustard Therapy. *JAMA*. 251(17): 2255-2261.
- Gueron G, De Siervi A, Ferrando M, Salierno M, De Luca P, Elguero B, Meiss R, Navone N, Vazquez ES, 2009. Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res*. 7(11): 1745-1755.
- Guo JS, Cho CH, Wang JY, Koo MW, 2002. Expression and immunolocalisation of heat shock proteins in the healing of gastric ulcers in rats. *Scand J Gastroenterol*. 37(1): 17-22.
- Gurunluoglu R, Gurunluglu A, 2003. Paul of Aegina: Landmark in Surgical Progress. *World Journal of Surgery*. 27(5): 18-25.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA, 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 400(6743): 464-468.
- Han XY, Wei HB, Zheng ZH, Huang JL, Wei B, Hu BG, 2009. Gene expression profile difference between colorectal cancer tissue and pericancerous mucosa by DNA microarray. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 12(1): 77-81.
- Hanahan D y Weinberg RA, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): 646-74.
- Hanahan D y Weinberg RA, 2000. The hallmarks of cáncer. *Cell*. 100(1): 57-70.
- Hanselmann C, Mauch C, Werner S, 2001. Haem oxygenase-1: a novel player in cutaneous wound repair and psoriasis? *Biochem. J*. 353(Pt 3): 459-466.

- Hara E, Takahashi K, Tominaga T, Kumabe T, Kayama T, Suzuki H, Fujita H, Yoshimoto T, Shirato K, Shibahara S, 1996. Expression of heme oxygenase and inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumours. *Biochem Biophys Res Coun.* 224(1): 153-158.
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. 2004. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 336(2): 241-250.
- Hileman EO, Liu J, Albitar M, Keating MJ, Huang P, 2004. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53(3): 209-19.
- Hill M, Pereira V, Chauveau C, Zagani R, Remy S, Tesson L, Mazal D, Ubillos L, Brion R, Asghar K, Mashreghi MF, Kotsch K, Moffett J, Doebis C, Seifert M, Boczkowski J, Osinaga, E, Anegon I, 2005. Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J.* 19(14): 1957-1968.
- Iacopetta B, 2003. TP53 Mutation in Colorectal Cancer. *Human Mutation.* 21(3):271-276.
- Imamura Y, Morikawa T, Liao X, Lochhead P, Kuchiba A, Yamauchi M, Qian ZR, Nishihara R, Meyerhardt JA, Haigis KM, Fuchs CS, Ogino S, 2012. Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 18(17): 4753-4763.
- Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC, 2005. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol Oncol.* 23(6): 402-406.

- Jancik S, Drabek J, Radzioch D, Hajduch M, 2010. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2010(150960): 1-13.
- Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D, 2011. Global Cancer Statistics *Ca Cancer J Clin.* 61(2): 69-90.
- Jeon EM, Choi HC, Lee KY, Chang KC, Kang YJ, 2009. Hemin inhibits hypertensive rat vascular smooth muscle cell proliferation through regulation of cyclin D and p21. *Arch Pharm Res.* 32(3): 375-382.
- Jozkowicz A, Was H, Dulak J, 2007. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend?. *Antioxidants and redox signaling.* 9(12): 2099-2117.
- Jozkowicz A, Huk I, Nigisch A, Weigel G, Dietrich W, Motterlini R, Dulak J, 2003. Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxid Redox Signal.* 5(2): 155-162.
- Kang KA, Maeng YH, Zhang R, Yang YR, Piao MJ, Kim KC, Kim GY, Kim YR, Koh YS, Kang HK, Hyun CL, Chang WY, Hyun JW, 2012. Involvement of heme oxygenase-1 in Korean colon cancer. *Tumour Biol.* 33(4): 1031-1038.
- Kelsen DP, Van de Velde CJH, Minsky BD. Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology. Philadelphia. In: Kelsen DP, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE. 2<sup>nd</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 749. ISBN: 978-0-7817-7617-2.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B, 1991b. Identification of p53 as a sequence specific DNA-binding protein. *Science* 252:1708-1711.

- Keyse SM y Tyrrell RM, 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(1): 99-103.
- Kikawa KD, Herrick JS, Tateo RE, Mouradian M, Tay JS, Pardini RS, 2010. Induced oxidative stress and cell death in the A549 lung adenocarcinoma cell line by ionizing radiation is enhanced by supplementation with docosahexaenoic acid. *Nutr Cancer*. 62(8): 1017-24.
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M, 2005b. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 338(1): 558-567.
- Kim DH, Song NY, Kim EH, Na HK, Joe Y, Chung HT, Surh Y, 2014. J5-Deoxy- $\Delta(12,14)$ -prostaglandin J2 induces p53 expression through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1 in human breast cancer cells. *Free Radic Res*. 48(9): 1018-1027.
- Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AM, 2004. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 18(10): 1080-1089.
- Kim JC, Koo KH, Kim BS, Park KC, Bicknell DC, Bodmer WF, 1999. Carcino-embryonic antigen may function as a chemo-attractant in colorectal-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 82(6): 880-885.
- Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JW, Tebar M, Riemersma S, Van Krieken JH, Punt CJ, Nagtegaal ID, 2011. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 104(6): 1020-6.

- Kokkonen N, Ulibarri IF, Kauppila A, Luosujärvi H, Rivinoja A, Pospiech H, Kellokumpu I, Kellokumpu S, 2007. Hypoxia upregulates carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. *Int J Cancer*. 121(11): 2443-2450.
- Konety BR, Nguyen TT, Dhir R, Day RS, Becich MJ, Stadler WM, Getzenberg RH, 2000. Detection of Bladder Cancer Using a Novel Nuclear Matrix Protein, BLCA-4. *Clinical Cancer Research*. 2618 (6): 2618-2625.
- Lam LT, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottelet M, Nong Y, Wen D, Adams J, Dang L, Staudt LM, 2005. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 11(1): 28-40.
- Lee SJ, Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Moon JH, Kang BW, Park JS, Park JY, Choi GS, 2011. No association of the hypoxia-inducible factor-1alpha gene polymorphisms with survival in patients with colorectal cancer. *Med Oncol*. 28(4): 1032-1037.
- Lee SY, Jo HJ, Kim KM, Song JD, Chung HT, Park YC, 2008. Concurrent expression of heme oxygenase-1 and p53 in human retinal pigment epithelial cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 365(4): 870-874.
- Lee-Young C, 2015. Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy. *Journal of Biomedical Science*. 22: 22.
- Levidou G, Saetta AA, Gigelou F, Karlou M, Papanastasiou P, Stamatelli A, Kavantzias N, Michalopoulos NV, Agrogiannis G, Patsouris E, Korkolopoulou P, 2012. ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics. *World J Surg Oncol*. 10: 47.

- Liefers GJ y Tollenaar RA, 2002. Cancer genetics and their application to individualized medicine. *Eur J Cancer*. 38: 872-879.
- Lin CW, Shen SC, Hou WC, Yang LY, Chen YC, 2008. Heme oxygenase-1 inhibits breast cancer invasion via suppressing the expression of matrix metalloproteinase-9. *Mol Cancer Ther*. 7(5): 1195-1206.
- Lin Q, Weis S, Yang G, Weng YH, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gaunitz F, Dennery PA, 2007. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem*. 282(28): 20621- 20633.
- Li Volti G, Ientile R, Abraham NG, Vanella A, Cannavo G, Mazza F, Curro M, Raciti G, Avola R, Campisi A, 2004. Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: effect of glutamate. *Biochem Biophys Res Commun* 315(2): 517-524.
- Liu, Chen GG, Ng EKW, Leung W, Sung JJY, Chung SCS, 2004. Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene*. 23(2): 503–513.
- Lu DY, Yeh WL, Huang SM, Tang CH, Lin HY, Chou SJ, 2012. Osteopontin increases heme oxygenase-1 expression and subsequently induces cell migration and invasion in glioma cells. *Neuro Oncol*. 14(11): 1367-1378.
- Maines MD, 2005b. The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid Redox Signal* 7(11-12): 1761-1766.
- Maines MD, 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554.

- Maines MD y Abrahamsson PA, 1996. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology*. 47: 727-733.
- Maines MD, 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*. 2(10): 2557-2568.
- Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK, 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 261(1): 411-419.
- Makrodouli E, Oikonomou E, Koc M, Andera L, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A, 2011. BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Mol Cancer*. 10: 118.
- Marx JL, 1989. Cancer Gene Research Wins Medicine Nobel. *Science*. 246(4928): 326-327.
- Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M, Marculescu R, Printz D, Fritsch G, Wagner O, Selzer E, Sperr WR, Valent P, Sillaber C, 2004. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 64(9): 3148-3154.
- McAllister SC, Hansen SG, Ruhl RA, Raggio CM, DeFilippis VR, Greenspan D, Früh K, Moses AV, 2004. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces heme oxygenase-1 expression and activity in KSHV-infected endothelial cells. *Blood*. 103(9): 3465-3473.
- McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD, 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J*

Biochem 247(2): 725-732.

Meiller A, Alvarez S, Drané P, Lallemand C, Blanchard B, Tovey M, May E, 2007.

p53-dependent stimulation of redox-related genes in the lymphoid organs of gamma-irradiated--mice identification of Haeme-oxygenase 1 as a direct p53 target gene. *Nucleic Acids Res.* 35(20): 6924-6234.

Miyata Y, Kanda S, Mitsunari K, Asai A, Sakai H, 2014. Heme oxygenase-1

expression is associated with tumor aggressiveness and outcomes in patients with bladder cancer: a correlation with smoking intensity. *Transl Res.* 164(6): 468-476.

Molina-Vila MA, Bertran-Alamillo J, Gascó A, Mayo-de-las-Casas C, Sánchez-

Ronco M, Pujantell-Pastor L, Bonanno L, Favaretto AG, Cardona AF, Vergnenègre A, Majem M, Massuti B, Morán T, Carcereny E, Viteri S, Rosell R, 2014. Nondisruptive p53 mutations are associated with shorter survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 20(17): 4647-4659.

Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Anatomía con orientación clínica. 6ª Edición Ed.

Barcelona. Lippincott Williams & Wilkins. 2010. 1164. ISBN 978-84-96921-47-4.

Morton LT y Moore RJA. A chronology of Medicine and Related Sciences.

Aldershot, England. Scholar Press. 1997.784.

Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T, 2004. Heme oxygenase-1: a new therapeutic

target for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 20(1): 177-84.

Nam SY y Sabapathy K, 2011. p53 promotes cellular survival in a context-

dependent manner by directly inducing the expression of haeme-oxygenase-1. *Oncogene.* 30(44): 4476-4486.

- Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A, 2009. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 205 (12): 858-62.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau, Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 376(6535): 37-43.
- Nissan A, Guillem JG, Paty PB, Wong WD, Cohen AM, 1999. Signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: a matched control study. *Dis Colon Rectum.* 42(9): 1176-1180.
- Noel A y Tyrrell RM, 1997. Development of refractoriness of induced human heme oxygenase-1 gene expression to reinduction by UVA irradiation and hemin. *Photochem Photobiol.* 66(4): 456-463.
- Oliver M, Hollstein M, Hainaut P, 2010. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(1): a001008.
- Otero Regino W, Velasco H, Sandoval H, 2009. Papel protector de la bilirrubina en el ser humano. *Revista Colombiana de Gastroenterología.* 24(3): 293-301.
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH, 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24(8): 449-455.
- Orozco-Ibarra M y Pedraza-Chaverrí J, 2010. Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. *Arch Neurocién.* 15(1): 47-55.

- Ortega MV, Gualco G, Musto ML, Wins R, Maggiolo J, Ardao G, 2005. Tumor fibroso solitario de la pleura. Aspectos clínico-patológicos. *Rev Esp Patología*. 38(1): 21-25.
- Pantel K, Cote RJ, Fodsyad O, 1999. Detection and Clinical Importance of Micrometastatic Disease. *Journal of the National Cancer Institute*. 91(13): 1113-1124.
- Parfenova H, Neff RA, Alonso JS, Shlopov BV, Jamal CN, Sarkisova SA, Leffler CW, 2001. Cerebral vascular endothelial heme oxygenase: expression, localization, and activation by glutamate. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(6): C1954-C1963.
- Paul G, Bataille F, Obermeier F, Bock J, Klebl F, Strauch U, Lochbaum D, Rümmele P, Farkas S, Schölmerich J, Fleck M, Rogler G, Herfarth H, 2005. Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. *Clin Exp Immunol*. 140(3): 547-555.
- Pelicano H, Carew JS, McQueen TJ, Andreeff M, Plunkett W, Keating MJ, Huang P, 2006. Targeting Hsp90 by 17-AAG in leukemia cells: mechanisms for synergistic and antagonistic drug combinations with arsenic trioxide and Ara-C. *Leukemia*. 20(4): 610-619.
- Poulos TL, 2005. Structural biology of heme monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 337-345.
- Prawan A, Kundu JK, Surh YJ, 2005. Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection. *Antioxid Redox Signal* 7(11-12): 1688-1703.
- Raju, TN. 1998. The Nobel Chronicles. *The Lancet*. 352(9140): 1635.

- Rampazzo E, Bertorelle R, Serra L, Terrin L, Candiotto C, Pucciarelli S, Del Bianco P, Nitti D, De Rossi A, 2010. Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br J Cancer*. 102(8): 1300-1305.
- Riddell RH y Levin B, 1977. Ultrastructure of the "transitional" mucosa adjacent to large bowel carcinoma. *Cancer*. 40(5): 2509-2522.
- Robinson SR, Dang TN, Dringen R, Bishop GM, 2009. Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke. *Redox Rep*. 14(6): 228-235.
- Rodríguez-Hernández A, Brea-Calvo G, Fernández-Ayala DJ, Cordero M, Navas P, Sánchez-Alcázar JA, 2006. Nuclear caspase-3 and caspase-7 activation, and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis. *Apoptosis*. 11(1): 131-139.
- Rosas Marroquín N y Torres E, 1999. Asociación entre la Proteína p53 Mutada, Grado de Infiltración y Tamaño del Tumor en Cáncer Colorrectal. Hospital Central FAP 1987-1996. *Revistas de investigación UNMSM*. 60(2):85-92.
- Rosner F. *The Medical Legacy of Moses Maimonides*. Hoboken, NJ: Ktav Publishing House Inc. 1998. 308. ISBN-10: 881255734/ISBN-13: 978-0881255737.
- Sacca P, Meiss R, Casas G, Mazza O, Calvo JC, Navone, N, Vazquez E, 2007. Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *Br. J. Cancer*. 97(12): 1683-1689.
- Sánchez C, Rodeiro I, Garrido G, Delgado R, 2005. Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farm. Bonaerense*. 24 (4): 619-26.

- Sauma S, Yan Z, Ohno S, Friedman E, 1996. Protein kinase C $\beta$ 1 and protein kinase C $\beta$ 2 activate p57 mitogen-activated protein kinase and block differentiation in colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 7: 587-594.
- Scabini M, Stellari F, Cappella P, Rizzitano S, Texido G, Pesenti E, 2011. In vivo imaging of early stage apoptosis by measuring real-time caspase-3/7 activation. *Apoptosis.* 16(2): 198-207.
- Schacter BA y Kurz P, 1982. Alterations in hepatic and splenic microsomal 28 electron transport system components, drug metabolism, heme oxygenase activity, and cytochrome P-450 turnover in Murphy-Sturm lymphosarcoma-bearing rats. *Cancer Res.* 42: 3557-3564.
- Seo GS, Jiang WY, Chi JH, Jin H, Park WC, Sohn DH, Park PH, Lee SH, 2015. Heme oxygenase-1 promotes tumor progression and metastasis of colorectal carcinoma cells by inhibiting antitumor immunity. *Oncotarget.* 6(23): 19792-806.
- Sharma A, Tripathi M, Satyam A, Kumar L, 2009. Study of antioxidant levels in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 50(5): 809-15.
- Shibahara S, Muller R, Taguchi H, Yoshida T, 1985. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(23): 7865-7869.
- Shi ZR, McIntyre LJ, Knowles BB, Solter D, Kim YS, 1984. Expression of a carbohydrate differentiation antigen, stage-specific embryonic antigen 1, in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 44(3): 1142-1147.
- Skrzypek K, Tertilt M, Golda S, Ciesla M, Weglarczyk K, Collet G, Guichard A, Kozakowska M, Boczkowski J, Was H, Gil T, Kuzdzal J, Muchova L, Vitek L, Loboda A, Jozkowicz A, Kieda C, Dulak J, 2013. Interplay between Heme

- Oxygenase-1 and miR-378 Affects Non-Small Cell Lung Carcinoma Growth, Vascularization, and Metastasis. *Antioxid Redox Signal*. 19(7): 644-660.
- Slebos DJ, Ryter SW, van der TM, Liu F, Guo F, Baty CJ, Karlsson JM, Watkins SC, Kim HP, Wang X, Lee JS, Postma DS, Kauffman HF, Choi AM, 2006. Mitochondrial Localization and Function of Heme Oxygenase-1 in Cigarette Smoke-Induced Cell Death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(4): 409-417.
- Spruessel A, Steimann G, Jung M, Lee SA, Carr T, Fentz AK, Spangenberg J, Zornig C, Juhl HH, David KA, 2004. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques*. 36(6): 1030-1037.
- Stachowicz-Stencel T, Synakiewicz A, Bien E, Adamkiewicz-Drozynska E, Wybieralska-Dubaniewicz M, Balcerska A, 2011. Multiple primary cranio-spinal tumours in a 13-year-old female with neurofibromatosis type 2 management strategy. *Childs Nerv Syst*. 27(1): 175-8.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN, 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235(4792): 1043-1046.
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, Tashiro S, Takahashi S, Shibahara S, Alam J, Taketo MM, Yamamoto M, Igarashi, 2002. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J*. 21(19): 5216-5224.
- Suttner DM y Dennery PA, 1999. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J*. 13(13): 1800-1809.

- Takagi T, Naito Y, Mizushima, K, Nukigi Y, Okada H, Suzuki T, Hirata I, Omatsu T, Okayama T, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T, 2008. Increased intestinal expression of heme oxygenase-1 and its localization in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 23(2): S229-S233.
- Temin HM, 1976. The DNA Provirus Hypothesis. *Science.* 192(4244): 1075-1080.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R, 1970. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med.* 75(3): 410-421.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R, 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 244(33): 6388-6394.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R, 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61(2): 748-755.
- The American Cancer Society Inc., The History of Cancer. 25 Mar. 2002. 13-17 June.2005. <http://www.cancerquest.org/printfriendly.cfm?printsec=415&lang=spanish>
- Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M, 2000. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res.* 91(9): 906-910.
- Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD, 1986. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *J Biol Chem.* 261(24): 11131-11137.
- Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, Toyooka H, Yoshida H, 1999. Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett.* 138(1-2): 53-59.

- Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM, 2003. Use of plasma mmp-2 and mmp-9 levels as a surrogate for Tumor expression in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer.* 107(4): 541-550.
- Udwadia FE. *Man and Medicine: A History.* New Delhi, Oxford University Press, 2000. xvi, 496. ISBN 0-19-565457-9.
- Urano A y Motohashi H, 2011. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide.* 25(2): 153-160.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1): 44-84.
- Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, Hartm AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse, JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R, 2002. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N.Engl.J Med.* 347: 1999-2009.
- Varghese J, Khandre NS, Sarin A, 2003. Caspase-3 activation is an early event and initiates apoptotic damage in a human leukemia cell line. *Apoptosis.* 8(4): 363-370.
- Viñas G, Puig T, Porta R, 2012. Estrés oxidativo en pacientes con cáncer, dos caras de una misma moneda. *Med Clin (Barc).* 139(4): 171-5.
- Wang J, Zhang M, Zhang L, Cai H, Zhou S, Zhang J, Wang Y, 2010. Correlation of Nrf2, HO-1, and MRP3 in gallbladder cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. *J Surg Res.* 164(1): e99-105.

- Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye Y, Cho CH, 2001. Protective role of heme oxygenase-1 in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281(2): G586-G594.
- Warburg O, 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 124(3215): 269-70.
- Was H, Dulak J, Jozkowicz A, 2010. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr Drug Targets.* 11(12): 1551-1570.
- Wenz JJ, 2012. Predicting the effect of steroids on membrane biophysical properties based on the molecular structure. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1818(3): 896-906.
- Winder T, Mündlein A, Rhomberg S, Dirschmid K, Hartmann BL, Knauer M, Drexel H, Wenzl E, De Vries A, Lang A, 2009. Different types of K-Ras mutations are conversely associated with overall survival in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep.* 21 (5): 1283-1287.
- Wulfkühle J, Espina V, Liotta L, Petricoin EJ, 2004. Genomic and Proteomic Technologies for Individualization and Improvement of Cancer Treatment. *Eur J Cancer.* 40(17): 2623-32.
- Yanagawa T, Omura K, Harada H, Nakaso K, Iwasa S, Koyama Y, Onizawa K, Yusa H, Yoshida H, 2004. Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 40(1): 21-27.
- Yang Q, Mori I, Sakurai T, Yoshimura G, Suzuma T, Nakamura Y, Nakamura M, Taniguchi E, Tamaki T, Umemura T, Kakudo K, 2001. Correlation between

nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer. *Breast Cancer*. 8(2): 105-110.

Yin H, Fang J, Liao L, Maeda H, Su Q, 2014. Upregulation of heme oxygenase-1 in colorectal cancer patients with increased circulation carbon monoxide levels, potentially affects chemotherapeutic sensitivity. *BMC Cancer*. 14: 436.

Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A, 1982. The occurrence of molecular interactions among NADPH-cytochrome c reductase, heme oxygenase, and biliverdin reductase in heme degradation. *J Biol Chem* 257(13): 7786-7793.

Zambetti GP, Bargonetti J, Walker K, Prives C, Levine AJ, 1992. Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev*. 6:1143-1152.

Zhu X, Fan W, Li D, Lin M, Kung H, 2010. Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal tumors. *World J Gastroenterol*. 16(21): 2633-2637.

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

El contenido de este trabajo forma parte de las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos y simposios:

### Publicaciones

Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: Involvement of p53". Andrés NC, Fermento ME, Gandini NA, Romero AL, Ferro A, Donna LG, Curino AC, Facchinetti MM. *Exp Mol Pathol.* 97(3):321-31. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.09.012.

HO-1 decreases tumor progression in animal models of colorectal cancer: relevance of p53". Andrés NC, Arévalo J, Gandini NA, Fermento ME, Obiol D, Ferronato MJ, Facchinetti MM, Curino AC. En progreso.

### Trabajos en colaboración presentados en reuniones científicas

#### Nacionales

*Rol de Hemoxigenasa-1 en la progresión del cáncer colorrectal (CCR).* Andrés NC, Gandini N, Fermento M, González Donna L, Ferro A, Curino A, Facchinetti MM. LVI REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS (SAIC). Del 16 al 19 de noviembre 2011 - Mar del Plata, Argentina. Resumen publicado en *Medicina*, (71, supl III): pp 168. ISSN 0025.7680.

*Rol de hemoxigenasa-1 en la progresión del cáncer colorrectal (CCR): importancia de p53".* Andrés NC, Gandini NA, Fermento ME, Gonzalez Donna L, Ferro A, Facchinetti MM, Curino AC. LV REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS (SAIC). Del 17 al 20 de noviembre 2010 - Mar del Plata, Argentina. Resumen publicado en *Medicina*, (70, supl II): pp 217-218. ISSN 0025.7680.

*Expresión de Hemoxigenasa-1 en carcinomas colorrectales humanos y en un modelo animal de inducción con 1,2-Dimetilhidrazina"* Gandini NA, Andrés NC,

Lang MC, Fermento ME, Salomon DG, Gonzalez Donna ML, Ferro A, Facchinetti MM, Curino A. LIV REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS (SAIC). Del 18 al 21 de noviembre de 2009 - Mar del plata, Argentina. Resumen publicado en Medicina, 69(I):p 191. ISSN 0025.7680.

### ***Internacionales***

*Heme oxygenase-1 in colorectal carcinoma.* Gonzalez Donna ML, Gandini NA, Andrés NC, Ferro A, Salomón DG, Fermento ME, Grioli S, Facchinetti MM, Curino A. ESMO Conference: 12TH WORLD CONGRESS ON GASTROINTESTINAL CANCER. Del 30 de junio al 3 de julio de 2010 - Barcelona, España. Resumen publicado en Annals of Oncology, 21(VI):42. ISSN 0923-7534.