

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS



Participación del ácido 20-hidroxiicosatetraenóico (20-HETE) en el desarrollo Tumoral en un modelo Murino de Cáncer de próstata.

MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Trabajo presentado para optar al título de Magíster en
Investigación Biomédica.

Autora: **Mariana Cruz**

Directora: Dra. Susana Nowicki

Codirectora: Dra. Magali Pellon Maison

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” (CEDIE) CONICET – FEI – División de Endocrinología, Hospital de Niños R. Gutiérrez

A Juan, Mateo y Felipe

Para sanar el masculino en el árbol familiar

INDICE

INDICE.....	I
TABLA DE FIGURAS.....	V
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN	VII
ABREVIATURAS	XII
CAPITULO I.....	1
1. Planteamiento del Problema.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. Metabolismo del ácido araquidónico.....	2
2.1.1. Vía de la ciclooxigenasa (COX).....	2
2.1.2. Vía de la lipoxigenasa (LOX).....	3
2.1.3. Vía del Citocromo P450 (CYP).....	3
2.1.3.1. CYPs con actividad de 20-hidroxilasa.....	6
2.1.3.1.1. Regulación de su expresión.....	6
2.2. Ácido 20-hidroiecosatetraenóico (20-HETE).....	7
2.2.1. Mecanismo de acción.....	7
2.2.2. Acciones renales, vasoconstricción, hemodinamia.....	8
2.2.3. Efectos protumorigénicos. Características generales de la célula tumoral.....	8

2.2.3.1. Angiogénesis	10
2.2.3.2. Apoptosis y proliferación celular	10
2.2.3.3. Cascada Metastásica	13
2.3. Cáncer de próstata. Características Clínicas y Epidemiológicas	15
2.3.1. Etiología	16
2.3.2. Impacto de los andrógenos sobre el cáncer de próstata	18
2.3.3. 20-HETE y cáncer de próstata	20
CAPITULO II.....	22
1. HIPOTESIS.....	22
2. OBJETIVO GENERAL	22
3. OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
CAPITULO Iii.....	24
Materiales y métodos	24
1. Modelo murino de Cáncer de próstata	24
1.1. Mantenimiento de los animales	28
1.2. Cultivo Celular	28
1.2.1. Preparación del Medio 2x.....	30
1.2.2. Preparación del Matrigel	30
2. Estudios Preliminares.....	30

3.	Establecimiento del modelo	31
3.1.	Procedimiento de castración quirúrgica	33
3.2.	<i>Eutanasia de los Animales</i>	34
4.	Procesamiento de las muestras	35
4.1.	<i>Procesamiento de la muestra para el estudio Histológico.</i>	35
4.2.	Coloración Hematoxilina-Eosina (H&E)	35
4.3.	Inmunohistoquímica	36
4.4.	Evaluación de la expresión de CYP4F2	38
4.5.	Evaluación de la microvasculatura	38
4.6.	Evaluación de la proliferación celular	39
5.	Inmunodetección de proteínas – Western Blot.....	40
6.	Análisis estadístico de los datos.....	42
CAPITULO IV.....		43
4.	Resultados.....	43
4.1.	Desarrollo del modelo animal. Estudios preliminares	43
4.1.1.	Número de células inyectadas	43
4.1.2.	Sitio de inyección	44
4.1.3.	Vehículo utilizado	44
4.2.	Efecto de la depleción de andrógenos y de la inhibición sistémica de la síntesis del 20-HETE sobre las características de los tumores generados por células LNCaP.....	45

4.2.1. Crecimiento tumoral	45
4.2.2. Características de los tumores recolectados	47
4.2.2.1. Expresión del CYP4F2	47
4.2.2.2. Volumen tumoral final.....	49
4.2.2.3. Proliferación celular	51
4.2.2.4. Vascularización.....	52
4.2.2.5. Expresión del CYP4F2 y del RA en muestras tumorales	53
CAPITULO V.....	56
Discusión	56
CAPITULO VI.....	62
Conclusiones	62
BIBLIOGRAFIA	64

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Vías del metabolismo del ácido araquidónico (AA)</i>	5
Figura 2. <i>Características generales de las células en progresión tumoral</i>	9
Figura 3. <i>Fases del ciclo celular</i>	12
Figura 4. <i>Cascada metastásica</i>	14
Figura 5. <i>Anatomía de la próstata</i>	17
Figura 6. <i>Comparación de la anatomía prostática del humano y el ratón</i>	26
Figura 7. <i>Imágenes del procedimiento de castración quirúrgica</i>	34
Figura 8. <i>Curso temporal del crecimiento tumoral en ratones</i>	47
Figura 9. <i>Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CYP4F2</i>	48
Figura 10. <i>Fotografía representativa de tumores obtenidos de ratones de los diferentes grupos experimentales y análisis del tamaño tumoral final</i>	49
Figura 11. <i>Microfotografías representativas de la tinción H&E de cortes de tumores de los distintos grupos experimentales</i>	50
Figura 12. <i>Análisis de la proliferación celular en muestras de tumores murinos</i>	52
Figura 13. <i>Análisis inmunohistoquímico de la vascularización (expresión de CD31) en muestras de tumores murinos</i>	53
Figura 14. <i>Expresión de CYP4F2 y del RA (RA) en muestras de tumores murinos</i>	55

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, mi esposo e hijos, la razón de mi vida y fuerza motora.

A mi madre por su amor y generosidad, mi mayor ejemplo de trabajo y perseverancia.

A mi directora de tesis Dra. Susana Nowicki que quien con su visión confió en mí, y además de enseñar con amor y paciencia, no tan solo dirigió y acompañó, sino que también me dio alas. Eternamente agradecida. Entre las mujeres referentes en mi vida, usted es una de las más queridas.

A mi querida Sofy, mi amiga y compañera de viaje, quien tan generosamente me regalo afecto, conocimiento y dedicación de una manera desinteresada.

A mis queridas compañeras del laboratorio 13, Aye gracias por sentarte junto a mí y ayudarme a interpretar el primer Paper, a Ceci M, Flor, Celi y a la Dra. Pennisi, gracias, Pat, mi admiración profunda, las palabras no llegan a expresar el sentimiento.

A mi querida Dra. Colombero por ser también ejemplo y claro... por toda la música.

A la Dra. Marcela Venara por compartir sus conocimientos y guía en esta experiencia.

A la Bioquímica María Eugenia Rodríguez por su ayuda desinteresada.

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

Agradezco al Dr. Rodolfo Rey, director del Centro de Investigaciones endocrinológicas “Dr. Cesar Bergadá” (CEDIE-CONICET), por permitirme desarrollar mi trabajo de investigación junto a mis actividades en nuestro instituto. Por su apoyo y confianza.

A todos mis amigos y compañeros que formaron parte de esta jornada, cada palabra de aliento, cada sonrisa, cada abrazo y fundamentalmente por la escucha. Gracias infinitas.

Hemos llegado.

RESUMEN

El cáncer de próstata es una de las neoplasias malignas más frecuentes en la población masculina mundial, y la enfermedad metastásica la principal causa de muerte asociada a esta enfermedad^{1,2}. El requerimiento de nuevas drogas en el escenario terapéutico ha llevado a la búsqueda de nuevos participantes en el desarrollo de este tipo de tumor.

La relevancia del ácido 20-hidroxi-eicosatetraenoico (20-HETE), producto del metabolismo del ácido araquidónico por las isoformas del citocromo P450 (CYP4F2 y CYP4A11), ya ha sido estudiada en varios tipos tumorales, y existen evidencias *in vitro* e *in vivo* que sostienen su participación en algunos aspectos relevantes de la biología tumoral^{3,4}. Sin embargo, el conocimiento de su importancia en la biología del cáncer de próstata es muy escasa. Si bien datos previos, obtenidos *in vitro* demostraron la contribución del 20-HETE al sostenimiento de la viabilidad de células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (LNCaP)⁵, aun no existen datos *in vivo* que revelen su aporte al desarrollo tumoral.

Planteamos entonces, como **objetivo principal** del presente trabajo ***evaluar in vivo la participación del 20-HETE en el desarrollo tumoral en un modelo murino de cáncer de próstata hormono dependiente.***

Los objetivos específicos fueron:

Objetivo específico 1: *Esclarecer si la inhibición sistémica de la síntesis del 20-HETE disminuirá el crecimiento de tumores generados por células LNCaP en animales intactos.*

Objetivo específico 2: Comparar el efecto de la inhibición sistémica de la síntesis del 20-HETE sobre el crecimiento de tumores generados por células LNCaP entre animales intactos y orquiectomizados.

Para ello desarrollamos un modelo murino de cáncer de próstata en ratones inmunosuprimidos. De los estudios preliminares realizados concluimos que, en nuestras condiciones experimentales, el modelo más favorable sería la inyección en el flanco dorsal derecho de células sensibles a andrógenos, LNCaP, (5×10^6 cel/0,1ml), resuspendidas en Matrigel. Cuando los tumores alcanzaron un volumen entre 100-150 mm³, los animales fueron separados aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales: intactos (CONTROL), sometidos a castración quirúrgica (QX), tratados con un inhibidor de la síntesis del 20-HETE (HET0016), y castrados-tratados (QX+HET0016). Para la inhibición sistémica de la síntesis del 20-HETE se utilizó N-hydroxy-N'-(4-n-butyl-2-methylphenyl) Formamidine (HET0016, 10mg/kg/día, vía de administración intraperitoneal (i.p) cinco días a la semana)⁶. Los tumores se midieron tres veces por semana y los animales fueron sacrificados cuando el diámetro mayor tumoral llegó a los 17,0 mm.

Las muestras tumorales obtenidas de la necropsia fueron separadas para el estudio histológico e inmunohistoquímico y para determinar la expresión de proteínas totales por Western blot.

En el análisis del curso temporal del crecimiento de los tumores se observó que éste fue sostenido en los animales controles. Por el contrario, en los grupos HET0016 y QX, el crecimiento fue menor durante la primera semana, pero, entre los días siete y catorce

aproximadamente, la pendiente de crecimiento se asemejó al control. En cambio, la tasa de crecimiento tumoral fue sostenidamente menor en el grupo QX+HET0016, hasta el día nueve y, con la excepción de un repunte transitorio entre los días nueve - dieciséis, la tasa de crecimiento permaneció baja hasta el sacrificio de los animales. El volumen tumoral final resultó menor al control en todos los grupos experimentales (control $1271 \pm 43 \text{ mm}^3$, QX $1041 \pm 22 \text{ mm}^3$, HET0016 $1084 \pm 42 \text{ mm}^3$, QX+HET0016 $857 \pm 47 \text{ mm}^3$, vs. Control * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $P < 0.0001$ para los grupos HET0016, QX y QX+HET0016 respectivamente).

El examen histológico de los preparados reveló una arquitectura tumoral conservada, con células poliédricas con núcleos redondeados y eucromáticos, y nucleolos evidentes. No hubo diferencias entre grupos a excepción del grupo QX+HET0016, donde se observan células con cromatina nuclear condensada, con apariencia de picnosis, y citoplasma vacuolado. La expresión inmunohistoquímica de CYP4F2 resultó positiva en todos los preparados.

Del análisis de las muestras tumorales surge que la proliferación celular, estimada por el índice mitótico, fue menor al control en todos los grupos restantes (en %: control $13.20 \pm 1,15$, QX $3.51 \pm 0,42$, HET0016 $10.37 \pm 0,70$, QX+HET0016 $3.34 \pm 0,66$, vs. Control: HET0016 $p \leq 0.05$; QX y QX+HET0016 $p \leq 0.0001$). En cuanto a la vascularización, evaluada por la expresión del marcador vascular CD31, el análisis cuantitativo mostró una disminución significativa de 69% respecto del control sólo en el grupo QX+HET0016 ($p < 0,01$). En este último grupo la vascularización también resultó menor a los grupos QX y HET0016 ($p < 0,05$ para ambos).

Finalmente, se analizó por Western blot la expresión del CYP4F2 y del receptor de andrógenos en homogenatos tumorales. La expresión del CYP4F2 fue significativamente menor al control en los grupos QX y QX+HET0016 ($p < 0,01$ para ambos). El tratamiento con HET0016 redujo la expresión del CYP4F2 respecto del grupo QX ($p < 0,01$). En cuanto al receptor de andrógenos, en el grupo QX su expresión aumentó en un 90% respecto del control ($p \leq 0.0001$), sin cambios en el grupo HET0016. El efecto más relevante del tratamiento con HET0016 fue la dramática reducción de la expresión del receptor de andrógenos en el grupo QX+HET0016 respecto del grupo QX (77%, $p \leq 0.0001$), aún por debajo de la expresión en el grupo control ($p \leq 0.01$).

La reducción del volumen tumoral y del índice mitótico en los animales tratados con HET0016 sugiere que el 20-HETE desempeña un papel importante en el desarrollo del tumor. Por otro lado, el hecho de que el HET0016 no afectara la vascularización del tumor no desestima los efectos proangiogénicos del 20-HETE observados *in vitro*⁵, e indica que el 20-HETE no es el único responsable de este proceso. Así, su disminución puede haber sido compensada por otros factores proangiogénicos. Más aún, a partir de la importante disminución de la vascularización en los animales QX+HET0016, que también se observó en la tasa de crecimiento y en el volumen tumoral final, podríamos inferir que existe una cooperación entre el 20-HETE y los andrógenos en el desarrollo tumoral.

Es importante destacar que la combinación de ambos tratamientos redujo significativamente la expresión del CYP4F2 (y por ende la disponibilidad del 20-HETE), y revirtió la sobreexpresión del receptor de andrógenos secundaria a la castración. Debido a que la expresión de una amplia variedad de genes asociados a la tumorigénesis está bajo

regulación del receptor de andrógenos, esta última observación es clave para la interpretación del menor desarrollo tumoral en los animales QX+HET0016.

De esta forma, el presente trabajo aporta evidencias que señalan al 20-HETE como un participante en el desarrollo del cáncer de próstata. Los resultados aquí presentados abren la posibilidad de interferir en un futuro con su síntesis como una posible herramienta terapéutica, en particular asociado a terapias de depleción androgénica.

ABREVIATURAS

5-6 EET	5-6, ácido epoxieicosatrienóicos
8-9 EET	8-9, ácido epoxieicosatrienóicos
11-12 EET	11-12, ácido epoxieicosatrienóicos
14-15 EET	14-15, ácido epoxieicosatrienóicos
20-HETE	Ácido 20-hidroxieicosatetraenóico
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
CICUAL	Comité institucional de cuidado y uso de animales de laboratorio
CD31	Cluster de diferenciación 31
COX	Ciclooxigenasa
CPCNP	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CYP	Citocromo P450
CYP2	CYP perteneciente a la familia 2 del citocromo P450

CYP4	CYP perteneciente a la familia 4 del citocromo P450
DHT	Dihidrotestosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EET	Ácido epoxieicosatrienóico
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
EPC	Células epiteliales progenitoras
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
G0	Fase quiescente celular
G1	Fase intermedia 1 del ciclo celular
G2	Fase intermedia 2 del ciclo celular
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GEM	Ratones modificados genéticamente
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GPR75	Receptor 75 acoplado a la proteína G (Gaq/11)
HET0016	N-hidroxi-N'-(4-n-butil-2-metilfenil) Formamidina
HETEs	Ácidos hidroxieicosatetraenóicos
HGPIN	Hiperplasia intraepitelial prostática de alto grado

HIF-1 α	Factor inducible de la hipoxia 1 alfa
HOs	Hepoxilinas
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IARC	Agencia internacional de investigación sobre el cáncer
INC	Instituto nacional del cáncer
IP	Intraperitoneal
LNCaP	Células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos
LOX	Lipoxigenasa
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
M	Mitosis
MMP	Metaloproteasas de matriz
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<i>NIH(S)Fox1N^{nu/nu}</i>	Ratón inmunodeficiente originado en NIH homocigota para el gen nude
NODSCID	Non-obese diabetic severe combined immunodeficiency
NOG/NSG	NOG noggin / NOD scid gamma mouse
-OH	Grupo funcional hidroxilo
PLA-2	Fosfolipasa A2

PBS	Buffer fosfato salino
PC-3	Células de cáncer de próstata no sensibles a andrógenos
PDVF	Fluoruro de polivinilideno
PECAM-1	Molécula de adhesión endotelial plaquetaria
PG	Prostaglandina
PKC	Proteína quinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PPARs	Receptores activados de proliferación de los peroxisomas
PSA	Antígeno prostático específico
QX	Grupo experimental castrado
RA	Receptor de andrógenos
RAG	Gen activador de la recombinación
RNA _m	ARN mensajero
S	Fase de síntesis del ciclo celular
S.C.	Subcutáneo
SFB	Suero fetal bovino
SCID	Inmunodeficiencia combinada grave
SDF-1 α	Factor derivado del estroma 1alfa

SREBP-1	Proteína de unión al elemento regulatorio por esteroides 1
TDA	Terapia de privación de andrógenos
TBS-T	Solución tampón salina de tris con Tween 20 [®]
TXA2	Tromboxano A2
U-251	Línea celular de gliosarcoma humano
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

CAPITULO I

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La próstata es una glándula particularmente sensible a la acción de los andrógenos. Los andrógenos son esenciales para el desarrollo de la próstata normal y, en caso de generarse un tumor en la glándula, regulan asimismo su crecimiento durante las primeras etapas del desarrollo tumoral. Esta dependencia dio origen a la terapia de privación de andrógenos como principal tratamiento del cáncer de próstata. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes las neoplasias se vuelven refractarias al tratamiento de privación dando origen a tumores que suelen resultar aún más agresivos (CRPC, del inglés, Castration Resistant Prostate Cancer). La persistencia de la actividad del receptor de andrógenos (RA) en los pacientes con CRPC, a pesar de la disminución de los niveles de testosterona sérica por el tratamiento de ablación hormonal, requiere de la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas⁷.

El ácido 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE) ha sido identificado como una molécula necesaria para el sostenimiento de la viabilidad celular inducida por los andrógenos en células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (células LNCaP)⁵.

Existen evidencias bibliográficas *in vitro* que relacionan al 20-HETE con procesos clave para el desarrollo de otros tumores primarios y de sus metástasis⁸. Sin embargo, existen aún muy escasas evidencias en la literatura sobre el papel del 20-HETE en el cáncer de próstata. Además, si bien existen datos *in vivo* respecto de la acción del 20-HETE en otros modelos tumorales, por el momento se desconoce su papel en el desarrollo tumoral del cáncer de

próstata en modelos animales. Este punto en particular será abordado en el desarrollo del presente trabajo de tesis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Metabolismo del ácido araquidónico.

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturado de veinte carbonos que forma parte de los fosfolípidos que componen todas las membranas biológicas, y es particularmente abundante en cerebro, músculo e hígado⁹.

Su liberación al citoplasma es mediada por la acción de enzimas de la familia de la fosfolipasa A2 (del inglés PLA-2) activadas a través de neuro efectores como la adrenalina, la angiotensina II y la bradiquinina. La PLA-2 hidroliza el enlace éster de la posición 2 de los fosfolípidos, permitiendo la liberación del ácido graso y su metabolismo intracelular por una variedad de enzimas¹⁰.

El AA produce metabolitos biológicamente activos que difieren según las enzimas que los sintetizan: productos de la ciclooxigenasa (COX), de la lipoxigenasa (LOX), y del citocromo P450 (CYP)¹¹.

2.1.1. Vía de la ciclooxigenasa (COX).

La vía de la COX tiene dos principales enzimas, la COX-1 y la COX-2, críticas en los procesos de inflamación de los tejidos y la homeostasis. Ambas enzimas actúan sobre el AA que es metabolizado a un intermediario de las prostaglandinas (PGs), la PGH2⁷. La PGH2 es una PG inestable que es precursora de cinco de los prostanoides más importantes: PGD2, PGE2,

PGF₂, y PGI₂ (prostaciclina), y del tromboxano (TXA₂). Todos ellos tienen un rol significativo en los procesos de inflamación asociada al cáncer, la progresión tumoral y la metástasis⁸.

2.1.2. Vía de la lipoxigenasa (LOX).

El camino de la LOX produce diferentes compuestos, entre ellos leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs), hepoxilinas (HOs) y algunos de los ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs), implicados en el desarrollo de inflamación, reacciones alérgicas, broncoconstricción y vasoconstricción¹¹.

De este grupo de eicosanoides, los más estudiados son los LTs que son sintetizados en células del sistema inmune, por ejemplo: neutrófilos, monocitos y mastocitos, y tienen un rol clave en la inflamación¹².

2.1.3. Vía del Citocromo P450 (CYP).

Si bien las vías de la COX y la LOX fueron las primeras en ser estudiadas, trabajos pioneros de Estabrook, Capdevila y Falck caracterizaron una tercera vía del metabolismo del AA, la del CYP microsomal^{15,16}, e identificaron los productos finales de esta vía que resultaron ser diferentes a los prostanoides y los leucotrienos^{17,18}.

Los CYPs conforman una súper familia de proteínas que contienen un grupo HEMO en su estructura y catalizan reacciones de oxidación de diversos compuestos endógenos y exógenos. Para su función necesitan de la presencia de cofactores: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), NADPH reductasa, y el complejo Cytb5 oxidasa en presencia de oxígeno¹⁷. En el humano existen 57 genes y 41 proteínas activas que se agrupan en

familias y subfamilias en función a su homología estructural¹⁷. En el ratón, en cambio, existen 103 genes funcionales¹⁸.

Si bien se expresan abundantemente en el hígado donde participan, entre otras acciones, del metabolismo de xenobióticos, su expresión es generalizada.

Las isoformas del CYP tienen, además, la capacidad de transformar otros sustratos como colesterol, esteroides, vitaminas, y ácidos grasos. Con relación al metabolismo del AA, de acuerdo a la reacción que catalizan se pueden clasificar en:

1. Epoxigenasas: pertenecen a las subfamilias CYP2C y CYP2J y adicionan un grupo funcional epoxi (-O-) entre dos átomos de carbono adyacentes que previamente estaban unidos por un doble enlace. De esta manera se obtienen los ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs), que reciben su nombre de acuerdo con la posición donde está la unión al oxígeno: 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET y 14,15-EET.
2. ω -hidroxilasas o 20-hidroxilasas (esta última nomenclatura es la que se utilizará en el resto del trabajo): adicionan un grupo funcional hidroxilo (-OH) al carbono en posición veinte del AA. Este nuevo compuesto formado recibe el nombre de ácido 20-hidroxi-eicosatetraenólico (20-HETE). Esta vía es de gran interés para el presente trabajo.

La **Error! Reference source not found**. resume las vías metabólicas del AA.

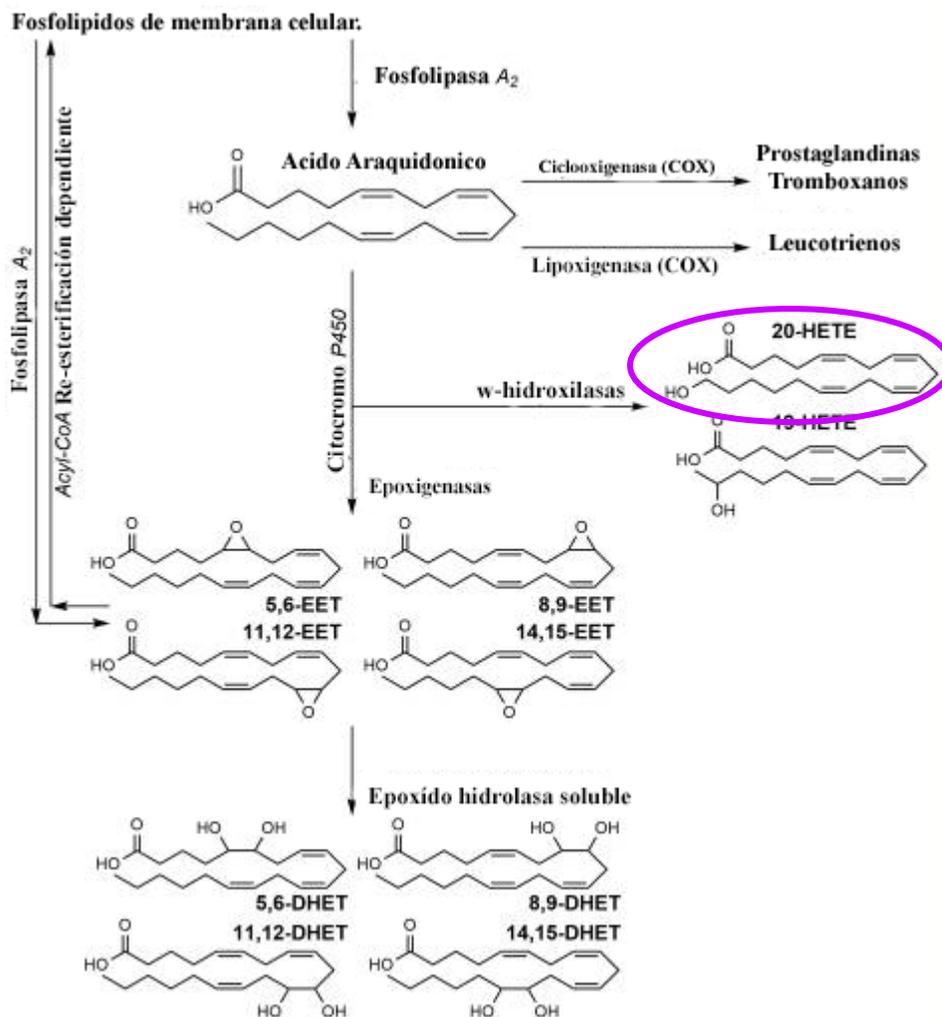


Figura 1. Vías del metabolismo del ácido araquidónico (AA). El AA es liberado por la fosfolipasa A₂ (PLA₂) al citoplasma donde puede sufrir oxidación a través de tres vías: la vía de la ciclooxigenasa, la vía de la lipoxigenasa, o del citocromo P450. Entre las isoformas de este último se encuentran las epoxigenasas y las ω-hidroxilasas. Los productos epoxigenados son inactivados por la hipóxido hidrolasa soluble. En el grafico se observan los productos del metabolismo del AA por las tres vías. Adaptado de "Expression and Function of Eicosanoid-Producing Cytochrome P450 Enzymes in Solid Tumors"¹⁹.

2.1.3.1. CYPs con actividad de 20-hidroxilasa.

Las principales isoformas del CYP con actividad 20-hidroxilasa pertenecen a las subfamilias 4A y 4F²⁰. En el humano las dos principales 20-hidroxilasas son el CYP4A11 y el CYP4F2 y, entre ellas, el CYP4F2 posee mayor actividad catalítica, por lo que se priorizará su estudio en este trabajo^{21, 22, 23}. Otras isoformas, incluyendo al CYP4F3, también poseen la capacidad de producir 20-HETE, aunque con menor actividad²⁴.

Las isoformas con actividad 20-hidroxilasa propias del ratón son el CYP4A10, el CYP4A12 y el CYP4A14, siendo el CYP4A12 la isoforma de mayor actividad biológica²⁵. Estas enzimas están expresadas en diferentes tejidos y sometidas a regulación transcripcional por diversos factores que son activados por hormonas y xenobióticos.

El músculo liso de los vasos sanguíneos constituye el sitio principal de expresión de 20-hidroxilasas^{26, 23}, si bien la síntesis de 20-HETE ha sido descrita también en el hígado, riñón, cerebro, pulmón, corazón y páncreas²⁷.

2.1.3.1.1. Regulación de su expresión.

Entre los factores de transcripción que regulan la expresión de estas isoformas se encuentran, por ejemplo, los receptores activados de proliferación de los peroxisomas (en inglés: PPARs) que controlan la expresión de CYP4A11 en el humano²⁸, y de los CYPs CYP4A10, CYP4A12 y CYP4A14 en el ratón^{29, 25}. Asimismo, se ha reportado que la expresión del CYP4F2 en el humano está bajo la regulación de la proteína de unión al elemento regulatorio por esteroides (en inglés: SREBP-1)³⁰. Además, los CYPs están sometidos a regulación epigenética, como por ejemplo la metilación del ADN³¹.

En relación directa con el tema de la presente tesis, trabajos pioneros sugirieron que los andrógenos aumentan la expresión de las 20-hidroxiilasas en el riñón de rata³². Asimismo, en tejido prostático de ratas adultas castradas, el tratamiento con andrógenos resultó en la inducción de la expresión de 20-hidroxiilasas³³. Finalmente, se ha sugerido que en células de cáncer de próstata de origen humano sensibles a andrógenos (células LNCaP), la expresión del CYP4F2 está bajo regulación androgénica⁵.

2.2. Ácido 20-hidroxiicosatetraenóico (20-HETE).

Como ya dijimos, el ácido 20-hidroxiicosatetraenoico es el producto de la hidroxilación del AA en su carbono terminal. Se trata de una molécula aún poco conocida, a pesar de que los estudios pioneros que sugirieron su importancia en la fisiología y fisiopatología datan de la década del 80³⁴.

2.2.1. Mecanismo de acción.

Una vez sintetizado por las 20-hidroxiilasas, el 20-HETE puede ser incorporado a los fosfolípidos de membrana, liberado al citoplasma donde puede actuar como un segundo mensajero intracelular³⁵, o bien liberado al medio extracelular donde puede interactuar con su receptor, GPR75, recientemente identificado^{36, 37}. El receptor GPR75 es una proteína perteneciente a la familia de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR del inglés: G Protein-Coupled Receptors). El 20-HETE tiene alta afinidad por el receptor GPR75 (Kd = 3.75nM), y la unión ligando-receptor activa varias cascada de señalización implicados en el crecimiento y la proliferación celular^{36, 38}. En un trabajo reciente se ha descrito que la activación del receptor GPR75 por el 20-HETE aumenta el potencial metastásico de células

de cáncer de próstata no sensibles a andrógenos (células PC-3). Además de las acciones dependientes del receptor GPR75, el 20-HETE puede activar proteínas de forma directa e independiente del receptor, como se ha demostrado para la proteína quinasa C (PKC)³⁹.

2.2.2. Acciones renales, vasoconstricción, hemodinamia.

Los efectos del 20-HETE como agente vasoconstrictor de la microvasculatura de cerebro, mesenterio y músculo esquelético, y como regulador de la excreción de sodio a nivel del túbulo proximal renal han sido las más estudiadas desde su identificación^{44, 40}.

Además, como se describe a continuación, trabajos más recientes lo han vinculado a la fisiopatología de los procesos tumorales.

2.2.3. Efectos protumorigénicos. Características generales de la célula tumoral.

El cáncer es un grupo de patologías caracterizadas por un crecimiento celular sin freno y por la capacidad de estas células de diseminarse a puntos distantes distintos al de su origen. Entre las particularidades de estas células transformadas se destacan la persistencia de señales de proliferación, la evasión celular a estímulos supresores del crecimiento, la activación de programas de metástasis e invasión, la inmortalidad replicativa, la promoción de la angiogénesis, la resistencia a la muerte celular, la desregulación de programas de energía celular, y la evasión de la respuesta inmune. Figura 2. Es necesario aclarar que estas características no se encuentran presentes todo el tiempo en todas las células. Más bien hay que interpretar al tejido tumoral como un conjunto de elementos celulares dinámicos e interrelacionados entre sí y con su entorno (microambiente tumoral)⁴¹.



Figura 2. Características generales de las células en progresión tumoral. En el gráfico se representan las características para el desarrollo y progresión de la enfermedad. En el centro del gráfico se observan los componentes del microambiente tumoral. Adaptado de “Revisiting the hallmarks of cancer”⁴²

En condiciones normales los tejidos intercambian información con otro tipo de células a través del contacto célula-célula, citoquinas y de la matriz extracelular. Ocasionalmente, estas señales intercelulares que definen el contexto normal se interrumpen⁴³. Normalmente, estas condiciones son temporales y reversibles. Por el contrario, en el caso de los tumores se mantienen. La mayoría de los tumores representan un tejido regido por un programa de diferenciación disfuncional⁴⁴.

2.2.3.1. Angiogénesis

Las propiedades proangiogénicas del 20-HETE fueron inicialmente sugeridas por Amaral y col.⁴⁵. En un principio se sugirió que las células progenitoras endoteliales (del inglés, EPC) contribuyen a la vascularización, a la cicatrización y al desarrollo tumoral^{46, 47}. Varios estudios identificaron al sistema CYP4A11-20HETE como un novedoso regulador de varias funciones de las EPC relacionadas con la neovascularización⁴⁸.

Respecto del mecanismo por el cual el 20-HETE ejerce su acción proangiogénica se ha propuesto que el 20-HETE promueve la proliferación, la migración y la formación tubular de las células endoteliales progenitoras así como también la secreción de moléculas angiogénicas como el factor inducible de la hipoxia 1 alfa (del inglés HIF-1 α), el factor derivado del estroma 1alfa (del inglés SDF-1 α), y el factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés: VEGF)^{49, 50, 51}. Sin embargo, otros autores proponen que el 20-HETE actuaría torrente abajo del VEGF⁵².

Específicamente respecto de la angiogénesis tumoral, la inhibición sistémica de la síntesis de 20-HETE por HET0016 redujo el tamaño y la vascularización tumoral en un modelo de cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP)⁵³, así como también en tumores generados por células de cáncer de mama⁵⁴, sugiriendo así la importancia para la oncología de la potencial inhibición del efecto angiogénico del 20-HETE.

2.2.3.2. Apoptosis y proliferación celular

Se entiende por apoptosis al proceso fisiológico de muerte celular programada, caracterizada por la contracción de la célula, la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos. La apoptosis participa en la regulación de procesos fisiológicos

durante el desarrollo y en procesos patológicos⁵⁵. Su inhibición está asociada al desarrollo de diferentes tipos de tumores⁵⁶.

La proliferación celular, por su parte, alude al aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular. En un tejido normal este proceso ocurre de un modo minuciosamente controlado, y depende de las necesidades del organismo. En células tumorales en cambio, la proliferación ocurre de manera descontrolada⁵⁷.

La progresión del ciclo celular requiere de la replicación del genoma, la distribución equitativa de la masa celular y de una segregación precisa de cromosomas. Esto transcurre en cuatro fases:

Crecimiento 1 (G1). Durante esta fase se producen todas las proteínas necesarias para la síntesis del ADN. La célula aumenta de tamaño y se sintetiza nuevo material citoplasmático, sobre todo proteínas y ARN.

Síntesis (S). Es el periodo en que tiene lugar la duplicación del ADN. Cuando termina, el núcleo contiene el doble de ADN y proteínas nucleares, que asegura que cada una de las células hijas tendrá una copia completa de ADN.

Crecimiento 2 (G2). Se sigue sintetizando ARN y proteínas, se incrementan las proteínas citoplasmáticas y las organelas, por lo que la célula aumenta de tamaño y hay cambios visibles en la estructura celular que nos indican el principio de la mitosis o división celular.

Mitosis (M). En este periodo los cromosomas se separan y ocurre la división nuclear y celular.

Fase G0. En esta fase la célula está "quiescente", es decir, no está en división, por lo que se encuentra fuera del ciclo celular. La célula puede permanecer en G0 por días, semanas, o incluso años antes de dividirse otra vez. En presencia de señales, sobre todo extracelulares (factores de crecimiento u hormonas), las células son estimuladas a salir de G0 y entran a G1 para iniciar un nuevo ciclo de división⁵⁸.

La Figura 3 ilustra las fases del ciclo celular.

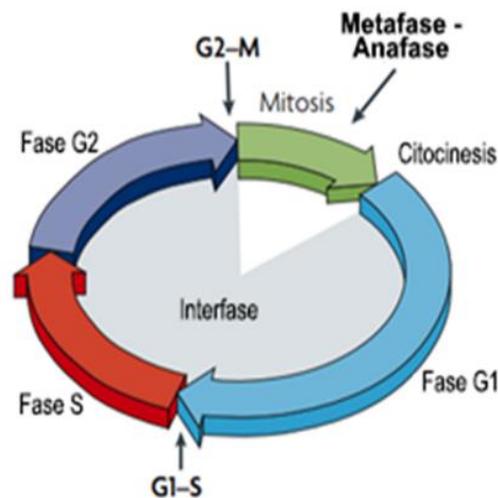


Figura 3. *Fases del ciclo celular.* En el diagrama se observa el progreso del ciclo celular con los puntos de control "checkpoints" G1-S y G2-M que evitan el avance a la siguiente fase si no se completó correctamente la anterior. Adaptado de "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?"⁵⁹.

El efecto del 20-HETE sobre estos procesos ha sido ya estudiado en algunos tipos tumorales y existen evidencias *in vitro* e *in vivo* que sostienen su impacto en estos aspectos relevantes de la biología tumoral⁶⁰. El efecto proliferativo del 20-HETE se demostró *in vitro* en la línea celular de glioma humano U-251, en la que la inhibición de su síntesis redujo la proliferación

de las células tumorales sin modificar la de las no tumorales⁶¹. Esto fue confirmado *in vivo* mediante la sobre expresión de la enzima de síntesis (CYP4A1) en las mismas células, que resultó en un fenotipo tumoral hiperproliferativo y más invasivo⁶². El efecto proliferativo del 20-HETE se corroboró también en células de gliosarcoma⁶³, y en dos líneas celulares de carcinoma renal de células claras (786-O y 769-P)⁶⁴. Además, en modelos animales de gliosarcoma⁶³, cáncer de pulmón⁵³ y de mama³ se demostró que la inhibición de la síntesis del 20-HETE redujo el crecimiento tumoral.

En cuanto al rol del 20-HETE en la apoptosis los hallazgos no son consistentes entre distintos tipos celulares. El 20-HETE incrementa la apoptosis inducida por diversas injurias en células renales, mientras que la inhibe en células endoteliales^{65, 66}.

En particular, en células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (LNCaP) el 20-HETE contribuye al sostenimiento de la viabilidad promovida por los andrógenos a través del aumento de la proliferación y una clara disminución de la apoptosis celular⁸.

2.2.3.3. Cascada Metastásica

Se entiende por cascada metastásica al proceso por el cual las células tumorales abandonan el tumor primario y son transportadas a otras partes del organismo a través de la circulación sanguínea o linfática. En los tumores epiteliales, la cascada metastásica se inicia con la proliferación de las células tumorales seguida de la transformación epitelio-mesenquimal (disminución de la expresión de e-caderina y el aumento de vimentina), la reorganización del citoesqueleto que favorece la migración, la vascularización del tumor, la ruptura de la

lámina basal mediante un proceso de invasión de la matriz extracelular, seguida por la intravasación de las células tumorales y la consecuente circulación sistémica. Diversos procesos determinan la detención de la célula tumoral en un capilar. Tras su detención, la célula tumoral procede a su extravasación a la matriz conectiva perivascular, para invadir y proliferar en su nuevo asentamiento y formar una metástasis. La Figura 4 ilustra este proceso.

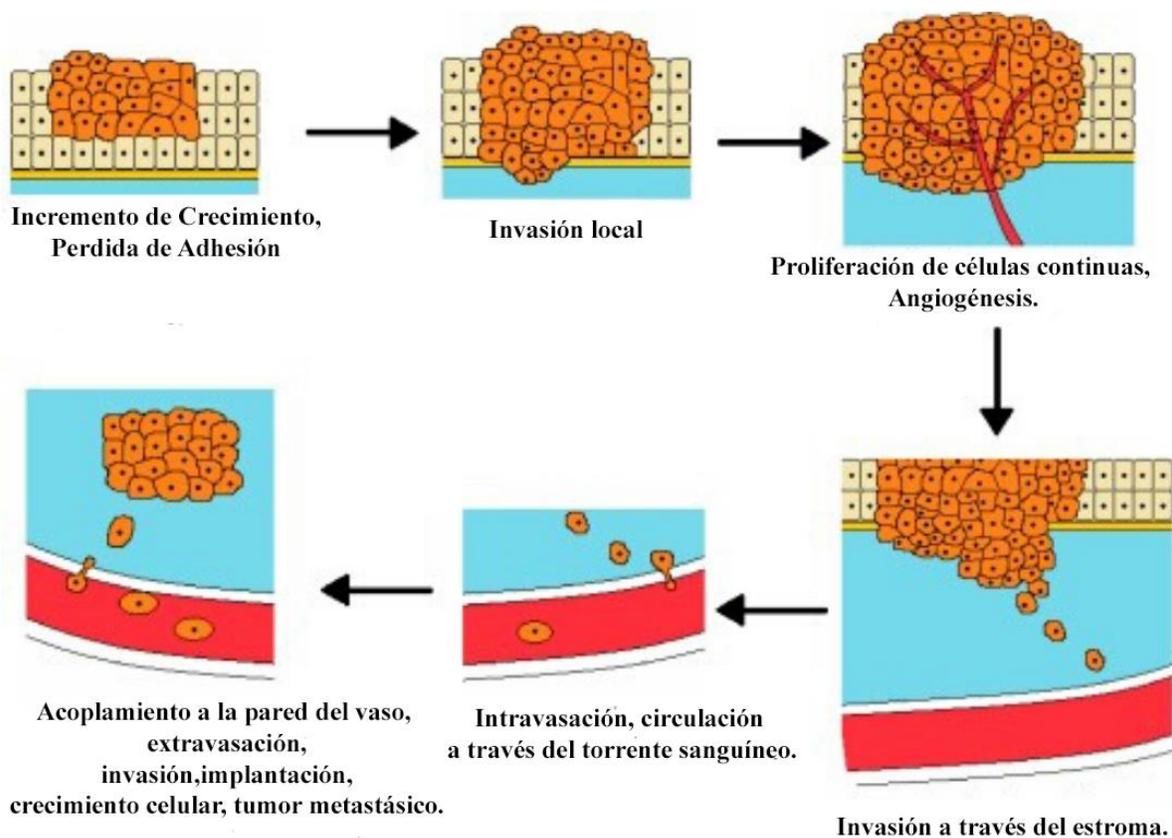


Figura 4. *Cascada metastásica.* Las células cancerosas se desarrollan y proliferan desde el sitio primario, para luego invadir a través del estroma del órgano primario. Después de la invasión y la implantación en el órgano distante, las células reanudan el proceso de aumento de la proliferación y angiogénesis para comenzar a formar tumor metastásico. Adaptado de "Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein"⁶⁷.

Respecto de la participación del 20-HETE en la cascada metastásica, los análogos estables del 20-HETE o la sobre expresión de 20-hidroxilasas aumentan la invasión de células de cáncer de pulmón humano, efecto mediado por el aumento de la expresión de la Metaloproteasa de Matriz 9 (MMP-9), tanto *in vitro* como en un modelo murino⁵³. Además, el tratamiento con el inhibidor de la síntesis de 20-HETE, HET0016, redujo las metástasis pulmonares y el tamaño del tumor primario en un modelo murino de cáncer de mama⁶⁸.

Finalmente, un trabajo reciente ha demostrado que la inhibición de la síntesis de 20-HETE por HET0016, o el antagonismo o silenciamiento de su receptor GPR75 mitigan el fenotipo maligno de las células de cáncer de próstata no sensibles a andrógenos (células PC-3)⁶⁹.

2.3. Cáncer de próstata. Características Clínicas y Epidemiológicas.

El cáncer de próstata es la quinta causa de muerte de hombres en el mundo detrás del de pulmón, colon, hígado y estomago; con un número de casos nuevos estimados del año 2020 de 1.414.259 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (del inglés, IARC). Argentina posee una tasa de incidencia de 42 casos por 100.000 habitantes, cifra que la posiciona entre los países con incidencia de cáncer media-alta, ubicándola en el quinto lugar en la región de las Américas, de acuerdo con las estimaciones de la IARC del año 2020. En los varones, la mayor incidencia en nuestro país está dada por el cáncer de próstata, con una ocurrencia de más de 11.686 casos anuales, que representan el 20% de todos los tumores malignos en varones.

El principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de próstata es la edad, el 99% de los casos ocurre en hombres mayores de 45 años, siendo la mediana de diagnóstico de 66 años. Además, se pueden agregar como factores de riesgo: ancestros africanos, historia familiar de cáncer de próstata y algunos tipos de cánceres hereditarios⁷⁰. Algunos estudios apuntan a que la ingesta excesiva de grasas y carnes procesadas puede incrementar el riesgo de desarrollarlo⁷¹, mientras que otros autores sugieren que la obesidad se ha asociado a un aumento en su agresividad^{72, 73}.

La enfermedad metastásica es la principal causa de muerte asociada al cáncer de próstata. Los ganglios linfáticos adyacentes a los tumores primarios suelen ser el primer sitio de metástasis, seguido los huesos, el hígado y los pulmones². En el humano se presentan con mayor frecuencia como lesiones osteoblásticas con características osteolíticas mixtas, que causan dolor intenso, hipercalcemia y fracturas frecuentes⁷⁴.

A pesar de los progresos recientes, el cáncer de próstata permanece como un problema médico significativo, ya que los pacientes son sometidos a terapias a veces ineficientes para la enfermedad metastásica⁷⁵.

2.3.1. Etiología

La próstata es un órgano urogenital masculino ubicado en la base de la vejiga que rodea la uretra. La función de la próstata está en relación al tejido glandular y fibromuscular que la compone. El tejido fibromuscular ayuda en la compartimentación de los líquidos durante la eyaculación. El tejido glandular participa en la función reproductiva a través de su contribución a la formación del líquido seminal. Está conformada por células epiteliales

secretoras y células basales. Las células secretoras se encuentran en mayor número, son sensibles a los andrógenos, y son las encargadas de la producción de dos proteínas específicas: la fosfatasa ácida prostática y el antígeno prostático específico (del inglés, PSA). En la glándula se distribuyen también un número acotado de células neuroendocrinas⁷⁶.

La próstata se compone de tres zonas glandulares, denominadas zonas central, periférica y de transición y una región no glandular en la próstata anterior, compuesta de estroma fibromuscular, que proporciona soporte estructural.

La Figura 5 ilustra anatomía de la próstata.

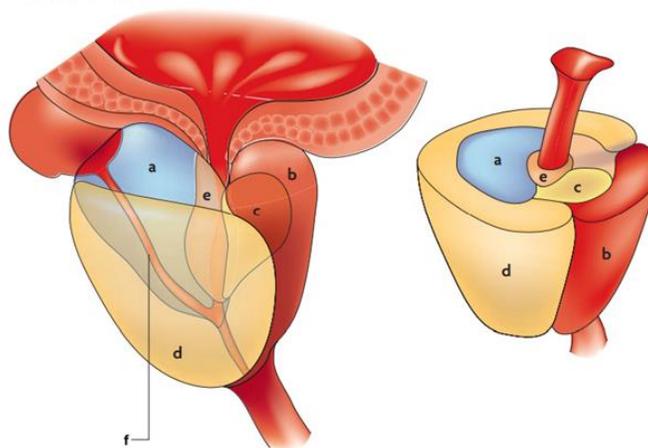


Figura 5. *Anatomía de la próstata.* a. Zona central, b. Zona fibromuscular, c. Zona de transición, d. Zona periférica, e. Región de la glándula periuretral, f. Conductos eyaculatorios. Adaptado de " *Inflammation and prostate carcinogenesis*"⁷⁷.

La mayoría de los adenocarcinomas se originan en la zona periférica de la glándula. La transformación de la célula y la progresión hacia un fenotipo maligno sigue varias etapas. La neoplasia intraepitelial prostática (del inglés, Prostatic Intraepithelial Neoplasia, PIN) es considerada una lesión premaligna y se divide en bajo y alto grado. Las neoplasias

intraepiteliales de alto grado se consideran precursoras del adenocarcinoma localizado, que puede progresar a un adenocarcinoma prostático avanzado con invasión local, culminando en metástasis⁷⁴.

2.3.2. *Impacto de los andrógenos sobre el cáncer de próstata*

La próstata es el órgano primario blanco de los andrógenos y su dependencia androgénica es bien conocida⁷⁸. El RA juega un papel importante en el desarrollo de la próstata normal, en el comienzo y la progresión del cáncer de próstata. El RA regula la transcripción de las proteínas que son requeridas para el funcionamiento normal de la glándula tal como el PSA. Se presume que, en el cáncer de próstata, las funciones críticas del RA tienen que ver con la estimulación de la expresión de una serie de genes que promueven la proliferación celular⁷⁹.

La testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) son los dos principales andrógenos en el hombre, siendo la testosterona la más importante en circulación y la DHT primordial en el tejido prostático. Las células de Leydig son las principales productoras del 90-95% de la testosterona circulante, y un 5-10% del total es sintetizado por las glándulas adrenales. En contraste, la DHT surge de la conversión de la testosterona del tejido por la 5 α reductasa prostática (isoformas 1 y 2)⁸⁰.

La sensibilidad a los andrógenos del cáncer de próstata fue reconocida primeramente por Huggins y Hodges (1941) quienes reportaron que la castración dejaba al tumor en un estadio de regresión⁸¹. Así, la terapia de supresión de andrógenos sigue siendo hasta el

presente la primera elección para el tratamiento inicial de la enfermedad. De forma semejante al humano, en el modelo animal, la proliferación celular decrece con la castración⁹⁶.

Históricamente los niveles de testosterona circulante han sido utilizados para evaluar la eficacia de la depleción hormonal. En pacientes con cáncer de próstata, la orquiectomía reduce los niveles de testosterona sérica hasta un 97%. Sin embargo, los niveles intrapróstático de DHT no cambian a pesar de la Terapia de Supresión de Andrógenos (TDA)⁸².

Pasados 3 o 5 años de la TDA, un alto porcentaje de los pacientes se vuelve refractario al tratamiento de depleción⁸³. Cuando la progresión de la enfermedad ocurre a pesar del mantenimiento de los bajos niveles de hormona circulante, la enfermedad es considerada como cáncer de próstata “resistente a la castración” (del inglés, Castration Resistant Prostate Cancer, CRPC).

Varias teorías sugieren las causas por las cuales se desarrolla el CRPC. Las células de cáncer de próstata podrían resistir la terapia de supresión de andrógenos a través de diversos mecanismos adaptativos tales como la sobreexpresión del RA, la mutación del RA en el dominio de unión de ligando que permite su activación por menores concentraciones de DHT, o bien por otros esteroides o sus precursores, variantes de splicing del RA que resultan constitutivamente activas, o la fosforilación del RA que aumenta su afinidad por el ADN y por lo tanto su actividad transcripcional^{84,15}. Las células de cáncer de próstata resistentes a la castración son más agresivas, muestran un patrón genético distinto, así como otras

propiedades moleculares que no están presentes en las células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos, y son generalmente las responsables del desarrollo de metástasis⁸⁵. Además, la conversión intratumoral de los precursores de andrógenos así como la esteroidogénesis *de novo*, proveen concentraciones intraprostáticas de andrógenos suficientes para la activación del RA aún con bajos niveles de testosterona plasmática⁸⁶.

2.3.3. 20-HETE y cáncer de próstata.

Las evidencias de la participación del 20-HETE en cáncer de próstata son escasas. En pacientes con cáncer de próstata se encontraron niveles de excreción urinaria de 20-HETE más elevados que en sujetos controles, que remitían a valores normales luego de la remoción del tumor. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias en la excreción del 20-HETE entre pacientes que presentaron neoplasia benigna o maligna⁸⁷.

Resultados obtenidos *in vitro*, indican que la disponibilidad del 20-HETE contribuye a mantener la viabilidad de células de cáncer de próstata de origen humano sensibles a los andrógenos (células LNCaP), y participa de la señalización del RA que regula la viabilidad celular⁸.

Más aún, se ha descrito que el estímulo del receptor GPR75 por el 20-HETE activa señales intracelulares vinculadas a la oncogénesis, y resulta en la transformación de células de cáncer de próstata hacia un fenotipo más agresivo. Así, el estímulo del receptor GPR75 en células PC-3 resultó en la transformación epitelio-mesenquimal, en alteraciones del citoesqueleto y un marcado aumento de la migración y la invasión celular⁶⁹.

En el presente trabajo de tesis se ha explorado el efecto de la inhibición de la síntesis de 20-HETE sobre el desarrollo tumoral *in vivo* utilizando un modelo murino de cáncer de próstata.

CAPITULO II

1. HIPOTESIS

Basados en: 1- que en el microambiente tumoral existen varias fuentes de origen para el 20-HETE además de la célula tumoral⁸⁸, 2- los hallazgos de nuestro laboratorio obtenidos *in vitro* que indican que el 20-HETE es un factor importante para mantener la viabilidad de células de cáncer de próstata⁸, 3- que el 20-HETE, generado ya sea en el estroma o en la célula tumoral, tiene un importante efecto angiogénico⁸⁹, 4- que otros autores han descrito la inhibición del crecimiento tumoral por la inhibición de las 20-hidroxilasas en modelos animales generados por una variedad de células tumorales⁴; se plantea la hipótesis de que la inhibición sistémica de la síntesis de 20-HETE disminuirá el desarrollo de tumores generados por células LNCaP.

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal del presente trabajo es evaluar *in vivo* el impacto del ácido 20 – hidroxieicosatetraenóico en el desarrollo tumoral en un modelo murino de cáncer de próstata hormono dependiente.

3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Objetivo específico 1: Esclarecer si la inhibición sistémica de la síntesis del 20-HETE disminuirá el crecimiento de tumores generados por células LNCaP en animales intactos.

Objetivo específico 2: Comparar el efecto de la inhibición sistémica de la síntesis del 20-HETE sobre el crecimiento de tumores generados por células LNCaP entre animales intactos y orquiectomizados.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo murino de Cáncer de próstata.

La especie animal más utilizada en experimentación científica en la actualidad es el ratón (*Mus musculus*). Esto se debe no sólo a sus características reproductivas, su tamaño y la facilidad de manejo, sino también a que su genoma es totalmente conocido. Esto último ha permitido el desarrollo de modelos animales que pueden reproducir características específicas o enfermedades del hombre y de los animales, convirtiéndose en reactivos biológicos cuyos resultados pueden extrapolarse al hombre y a otros mamíferos⁹⁰.

El estudio de modelos animales tumorales permite reconocer fenómenos que ocurren en el entorno de un organismo complejo, de manera tal que se complementan a los ensayos con células en cultivo y, además, permiten la intervención farmacológica *in vivo* para poder evaluar el efecto de la droga sobre el desarrollo tumoral⁹¹.

Un xenotransplante (del griego, “xenos” extranjero), o transplante heterólogo, es el transplante de células, tejidos u órganos de una especie a otra, idealmente entre especies próximas para evitar rechazo. Tales materiales se suelen llamar “xenoimplantes” o “xenotrasplantes”. En cambio, se denomina “alotrasplante” (del griego “álos”, otro) u homotrasplante, al transplante de células, tejidos u órganos de una persona a otra, genéticamente diferentes. Es el tipo de transplante más frecuente. Uno de los principales problemas que se plantean es el rechazo. El xenotrasplante de tumores se usó antes que

los alotrasplantes. Como ocurre con otras enfermedades, el cáncer de próstata no es común en el ratón. Luego de dos años de estudio en 612 ratones realizado por *The National Toxicology Program* no se identificaron casos espontáneos de carcinoma en la próstata⁹².

El xenotrasplante de células tumorales humanas a ratones inmunocomprometidos (del inglés xenograft) es una técnica de investigación frecuentemente utilizada en investigación oncológica. Este es uno de los descubrimientos más importantes que ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo a estos individuos en el primer modelo animal inmunodeficiente utilizado para experimentación⁹³.

En el presente trabajo se ha utilizado la cepa murina *NIH(S)Fox1N^{nu/nu}* nude. En esta cepa, la carencia de un timo funcional, que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras, hace que su sistema inmune sea deficiente. Por lo tanto los animales no rechazan tejidos alo o xenotransplantados⁹⁴.

La anatomía prostática en el ratón y el humano son diferentes. Figura 6. En el ratón, la próstata posee una estructura lobular formada por cuatro lóbulos -anterior (también conocido como glándula coagulativa), ventral, dorsal, y lateral (estos últimos lóbulos se refieren comúnmente como lóbulo dorsolateral). En cambio, la próstata humana tiene un solo lóbulo dividido en tres zonas: central, de transición y periférica.

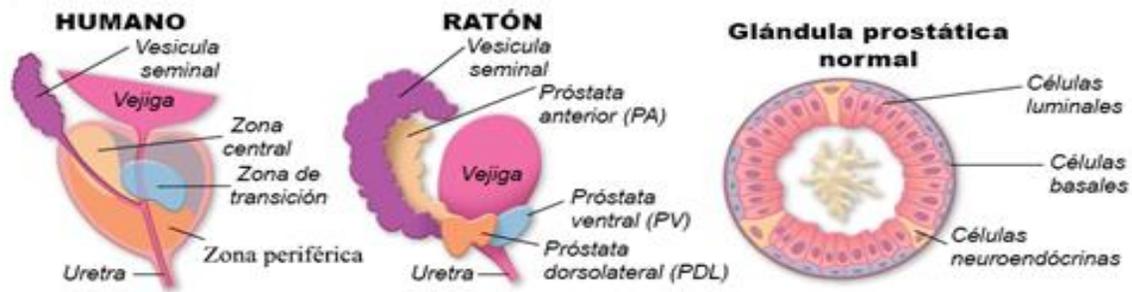


Figura 6. *Comparación de la anatomía prostática del humano y el ratón.* Se indican las zonas diferenciadas de cada especie. “Adaptado de *Genetics and biology of prostate cancer*”⁷⁴.

En el humano el cáncer de próstata se origina mayormente en la zona periférica, la cual compromete el 75% del tejido de la próstata. Si bien algunos autores consideran al lóbulo dorsolateral del ratón similar a la zona periférica del humano⁹⁵, otros autores no concuerdan con dicha similitud⁹².

Como ya se explicó, el cáncer de próstata espontáneo en las diferentes cepas murinas es poco común⁹². Por lo tanto en los últimos años se han generado diferentes modelos de ratones manipulados genéticamente (del inglés, genetically engineered mice, GEM) que simulan diferentes estadios de la patología humana; desde la hiperplasia intraepitelial prostática de alto grado (del inglés, HGPIN), hasta la diseminación de la metástasis⁹². Sin embargo, la diferencia en la anatomía de la próstata entre ambas especies, dificulta en los GEMs el estudio del desarrollo de alteraciones histopatológicas semejantes a las humanas⁹⁶.

El modelo murino de xenotransplante es un modelo animal de cáncer de próstata humano generado a través de la implantación de líneas celulares, tejidos, o cultivos primarios de

origen humano en ratones nude⁹⁷, SCID (del inglés: severe combined immunodeficiency) , NODSCID (del inglés: Non-obese diabetic severe combined immunodeficiency), NOG/NSG (del inglés: NOG noggin / NOD scid gamma mouse), or RAG (del inglés: recombination activating gene)⁹⁸. Esta implantación puede ser ortotópica (lugar donde naturalmente se desarrollaría el tumor) o heterotópica (fuera del lugar normal).

El modelo murino ortotópico ofrece la ventaja de que el desarrollo del tumor primario en su sitio original permite la interacción con el microambiente tumoral que le es natural, y la capacidad de hacer metástasis en los órganos distantes. Podría así decirse que es un modelo experimental más representativo y refinado. Sin embargo, la complejidad de la cirugía que debe desarrollarse en los animales inmunodeficientes para el implante de las células puede disminuir la supervivencia de éstos⁹⁹. Además, el seguimiento del crecimiento del tumor y de la respuesta al tratamiento sería inaccesible en principio, ya que éste crecería en la glándula prostática. Así, la medición del tumor se tomaría sólo en el punto final.

El modelo murino heterotópico subcutáneo (s.c.) tiene la ventaja de ser reproducible en los animales por utilizar una vía de fácil acceso para la implantación de las células, facilitar el seguimiento del desarrollo tumoral y de la respuesta al tratamiento. Esta observación facilita la determinación del punto final.

En trabajos previos de otros autores se ha utilizado la vía s.c. para la implantación de células de cáncer de próstata sensibles a andrógeno (LNCaP) y analizar el resultado del tratamiento sobre el crecimiento tumoral¹⁰⁰, así como de células LNCaP con mutaciones en su

receptor^{101, 102}. Estos trabajos fueron la base para la elección del modelo animal utilizado en nuestro estudio¹⁰³.

1.1. Mantenimiento de los animales

Los ratones *NIH(S)Fox1N^{nu/nu}* nude machos de 3-4 semanas fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata, se alojaron en el Bioterio del Hospital de Niños R. Gutiérrez, en condiciones estándares que incluyen ciclos de día/noche de 12 horas, con agua y comida *ad libitum*, en un armario ventilado y con control de temperatura. El cuidado y manipulación de los animales fueron hechos de acuerdo con las normas vigentes acorde a los lineamientos recomendados por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (del inglés: NIH)¹⁰⁴ y las directrices para el bienestar y el uso de animales en la investigación del cáncer¹⁰⁵. Todos los protocolos se realizaron bajo las normativas vigentes de cuidado y uso de animales de laboratorio, y han sido aprobados por el CICUAL de nuestra Institución.

1.2. Cultivo Celular

Se utilizó la línea celular comercial de cáncer de próstata LNCaP, gentilmente cedida por la Dra. Paula Sacca del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

La línea LNCaP es una línea celular de un adenocarcinoma humano, derivada de una metástasis en un nódulo linfático supraclavicular. Su principal característica es la sensibilidad a los andrógenos¹⁰⁶.

Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo de superficie 75 cm² (Corning, New York, EEUU), a 37°C en una estufa gaseada con 5% CO₂ por hasta 8 semanas y no más de 25 pasajes. El medio de cultivo, RPMI 1640 (Microvet, Buenos Aires, Argentina), fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Natocor, Córdoba, Argentina), penicilina (100UI/mL), estreptomycin (100ug/mL) y anfotericina B (2,5 µg/mL) (Life Technologies, Carlsbad, CA; EE. UU).

Una vez formada la monocapa celular, el medio de cultivo se descartó y las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS) estéril para remover los restos de suero que contienen inhibidores de tripsina. Luego se adicionó una solución de tripsina 0,02 mM (Thermofisher, Waltham, MA, EE. UU) y EDTA 0,48 mM (Life Technologies) y las células se incubaron a 37°C hasta que se observó al microscopio su desprendimiento. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio fresco y se contaron en cámara de Neubauer con una tinción de azul de tripán (0.4%). El volumen de suspensión que contenía el número de células a inyectar se centrifugó a 500xg por 10min, se descartó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 0,1mL/ratón (elegido como volumen de inyección) de Medio 2x o Matrigel (Corning, New York, EE. UU.).

1.2.1. Preparación del Medio 2x

El Medio 2x fue preparado con 90% de RPMI 2x 1640 (Microvet, Buenos Aires, Argentina) + 10% de SFB.

1.2.2. Preparación del Matrigel

Las células se resuspendieron en RPMI 1640 + SFB 10% (50% del volumen total de inyección) a 37°C, y se completó a volumen total con Matrigel. La suspensión se mantuvo sobre hielo hasta el momento de la administración ya que el Matrigel gelifica a temperaturas mayores a 4°C.

2. Estudios Preliminares

Las condiciones experimentales a ensayar surgieron de la experiencia del laboratorio en otros modelos animales tumorales, y de la revisión de las citas bibliográficas relativas al cáncer de próstata¹⁰³, que también se muestran en la TABLA 1

TABLA 1. Modelo experimental

Cita	N° de Células	Sitio de inyección	Vehículo
100	5x10 ⁶	Flanco dorsal	PBS
107	5x10 ⁶	Flanco dorsal	Matrigel
108 109	1 ó 2.5x10 ⁷	Flanco dorsal	Matrigel
110	8x10 ⁶	Flanco dorsal	Matrigel

En base a ello, en experimentos preliminares se comparó la proporción de aparición de tumores, el tiempo de latencia a la aparición del tumor, el volumen máximo alcanzado, y el tiempo hasta alcanzarlo, contrastando las siguientes variables:

- Cantidad de células: $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , 7×10^6
- Sitio de inyección: flanco dorsal derecho vs. pliegue nugal
- Vehículo: medio de cultivo 2x vs. Matrigel.

3. Establecimiento del modelo

A partir de los resultados de los experimentos preliminares, que se presentan en la sección “Resultados”, el modelo experimental definitivo se adecuó a las condiciones que se describen a continuación:

Se inyectaron células LNCaP (5×10^6 cel/0,1ml) resuspendidas en Matrigel en el flanco dorsal derecho, asegurando la correcta formación del habón de inyección.

En concordancia con la bibliografía, los tumores aparecieron al cabo de 4-6 semanas y fueron monitoreados diariamente hasta ser medibles. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen entre $100-150 \text{ mm}^3$ los animales fueron agrupados azarosamente en los siguientes grupos experimentales:

- A. Intactos, inyectados con vehículo. Nos referiremos a ellos como el grupo control.
- B. Castrados, inyectados con vehículo (QX),
- C. Tratados con el inhibidor de la síntesis de 20-HETE, N-hydroxy-N'-(4-n-butyl-2-methylphenyl) Formamidine, (HET0016),

D. Castrados y tratados con HET0016, (QX+HET0016).

En los grupos tratados con HET0016 (Grupo B y D), se realizaron inyecciones intraperitoneales (i.p.) diarias, 10 mg/kg/día de lunes a viernes⁶. Las soluciones de HET0016 fueron preparadas de forma extemporánea en una solución que utilizó como vehículo 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) +10% Captisol (CyDex Pharmaceuticals, Kansas, USA)¹¹¹ + PBS⁶.

En el grupo QX+HET0016 (Grupo D), el tratamiento con HET0016 comenzó a partir del tercer día luego de la orquiectomía. La efectividad de la administración sistémica del HET0016 se corroboró por la medida del contenido de 20-HETE en hígado utilizando el equipo comercial de ELISA (Biotarget, Detroit R&D, Detroit, MI; EEUU), según lo sugerido por el fabricante. El desarrollo de la reacción colorimétrica se cuantificó mediante lectura a 450nm en un espectrofotómetro de placas Multiskan EX (Thermo Scientific).

Los tumores se midieron tres veces por semana sobre los ejes perpendiculares más largos en el plano x/y utilizando un calibre vernier para el cálculo del volumen tumoral según la siguiente fórmula (Diámetro Mayor x (diámetro menor)²)/2.

Se realizaron controles periódicos del estado general de salud de los animales, sin observarse signos visibles de cambio en el comportamiento, disminución de consumo de alimento y agua, o disminución de peso corporal durante el periodo de estudio como indicadores de bienestar animal.

Los animales fueron sacrificados cuando el diámetro mayor tumoral llegó a los 17,1 mm.

3.1. Procedimiento de castración quirúrgica

Los ratones fueron pesados y anestesiados con una mezcla de ketamina 80mg/kg + xilacina 20mg/kg, (0,1 ml/10g, i.p.). Luego de corroborar el plano anestésico se realizó el abordaje de la cirugía por línea media para acceder a la cavidad abdominal, haciendo una incisión transversal de 1 a 1.5 cm.

A través de la incisión se tomó con pinzas de disección la grasa testicular, exponiendo testículos, epidídimo, vasos y conductos deferentes asociados para realizar una ligadura (vasos y conductos) para la remoción de ambos testículos. Para el cierre de la cavidad abdominal se realizó la sutura con puntos continuos del músculo recto abdominal con aguja e hilo de sutura Ethilon 5-0 (Ethicon, Somerville New Jersey EE. UU). Terminado este procedimiento se realizó el cierre de la herida en piel con adhesivo tópico (Dermabond, Ethicon). La zona de incisión fue topicada con Povidona Yodada. Luego de la cirugía los animales recibieron analgesia (tramadol, 10-30mg/kg cada 12 horas por 48 horas, i.p.). Durante el período de recuperación se colocó algodón embebido en solución fisiológica en los ojos. Los animales fueron monitoreados durante y después de la cirugía hasta su recuperación de la anestesia, observando respiración y controlando la temperatura corporal. La Figura 7 muestra algunas imágenes del procedimiento.

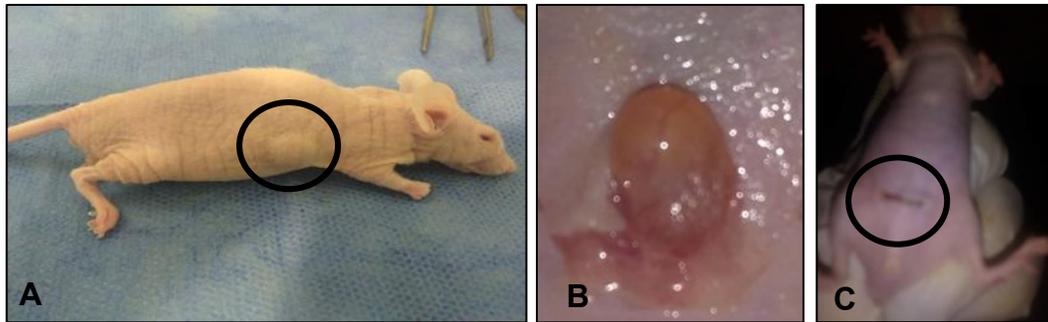


Figura 7. *Imágenes del procedimiento de castración quirúrgica.* A. Plano anestésico y tumor flanco dorsal derecho incipiente. B. Incisión abdominal con exposición de vejiga. C. Cicatrización postcirugía luego de aproximadamente 5 días.

La eficacia del procedimiento se corroboró mediante la medida de testosterona plasmática en los animales intactos y castrados. La extracción de la muestra de sangre se realizó por punción cardíaca previo al sacrificio. La determinación cuantitativa de testosterona en plasma se realizó por inmunoensayo (Elecys Testosterone II, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), adaptado para su empleo en el analizador Cobas E411.

3.2. Eutanasia de los Animales

Al finalizar el período de estudio, los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina 80mg/kg + xilacina 20mg/kg (0,1 ml/10g, i.p.). Dentro de los siguientes 30 min fueron sacrificados por dislocación cervical.

En la necropsia se recuperaron los tumores, se les quitó la cápsula y las zonas de necrosis macroscópica. Se seccionaron y se guardaron fijados en formol al 10%, para estudios de

histología e inmunohistoquímica, o bien se conservaron a -80°C en tubos secos para la determinación de la expresión de proteínas por Western blot.

4. Procesamiento de las muestras

4.1. *Procesamiento de la muestra para el estudio Histológico.*

Las muestras recuperadas en la necropsia fueron fijadas en formaldehído al 10 % en buffer fosfato 0,1M, pH 7,4 por 24 hs con el objetivo de preservar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Luego de la fijación fueron lavadas y sometidas a deshidratación mediante una secuencia de alcoholes etílicos (70° toda la noche, 3 pasajes por alcohol 96° (Sanicol, Esteban Echevarria, Argentina), y 3 pasajes por alcohol absoluto 100° (Biopack, Zarate, Argentina). Por último, las muestras fueron aclaradas en Xileno. Finalizada esta etapa fueron incluidas en parafina para el armado del bloque. La inclusión tiene como finalidad proporcionarle al tejido un soporte sólido que posibilite realizar un corte muy fino. Para realizar los cortes se utilizó un micrótopo rotatorio Reichert-Jung, modelo 2040. Los cortes sucesivos generaron una tira continua de cortes seriados. Cada corte se manipuló con pinces para asegurar que el tejido quedase perfectamente extendido para su fijación sobre la superficie del portaobjetos.

4.2. **Coloración Hematoxilina-Eosina (H&E)**

El primer paso previo a la coloración fue el desparafinado que consistió en sumergir los preparados histológicos en Xileno puro por 30 min a temperatura ambiente para eliminar

los excesos de parafina. Luego se pasaron por una serie de alcoholes etílicos en orden decreciente (un pasaje por alcohol absoluto 100° y dos pasajes por alcohol 96°, aproximadamente 5 min cada uno). Posteriormente se transfirieron a agua destilada durante unos min para lavarlos e hidratarlos preservando la calidad y el rendimiento del colorante en uso. Finalizado este proceso se sumergieron en una solución de Hematoxilina (Biopur, Rosario, Argentina) por 10 min, luego se los enjuagó con agua corriente durante 10 min. Para continuar se sumergieron en una solución de Eosina-Floxina (Merck, Billerica, MA, EE. UU, 0,5 % P/V) durante 1 min. Finalmente, se los lavó con agua para quitar el excedente de colorante. Se realizaron dos pasajes por alcohol etílico 96° y dos más por alcohol absoluto puro 100 %, todos de 5 min cada uno. Previo montaje se realizaron dos pasajes por Xileno puro. El medio de montaje utilizado fue Bálsamo de Canadá sintético (Biopack, Zarate, Argentina).

Finalizado esto, el material quedó preparado para la observación en el microscopio óptico.

4.3. Inmunohistoquímica

Previo proceso de desparafinado e hidratación de los preparados, se realizó la recuperación antigénica mediante la exposición en microondas a potencia máxima en 4 ciclos de 5 min cada uno en buffer citrato a pH 6. Terminado el último ciclo se dejó enfriar por 20 min y se lavó con agua destilada. Luego se realizó el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena (ubicada principalmente en los glóbulos rojos) con H₂O₂, para evitar la competitividad con la peroxidasa de rábano presente en alguno de los reactivos utilizados en esta técnica, y el bloqueo de sitios inespecíficos con albúmina humana (Sigma Chemical

co. St. Louis, USA) al 10 % P/V en PBS por 30 min. Posteriormente los preparados se incubaron toda la noche con cada anticuerpo primario.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: a) CYP4F2 (Abcam, Cambridge, UK), un anticuerpo policlonal producido en conejo contra la enzima CYP4F2, que, al metabolizar el ácido araquidónico presente en las membranas, produce ácido 20-hidroxieicosatetraenóico (20-HETE). Se utilizó en una dilución 1:500 en PBS. b) CD31 (Abcam, Cambridge, UK), que es anticuerpo monoclonal producido en ratón contra una proteína que se expresa en el citoplasma de las células endoteliales. Se usó en una dilución de 1:300 en PBS. Se buscó destacar principalmente el endotelio capilar y de vasos de pequeño calibre, difíciles de detectar con H&E.

Al siguiente día se lavó, se incubó con Multilink y Label (Biogenex, Fremont, CA, EE. UU) por 20 min a temperatura ambiente, para su posterior revelado con una dilución de 3,3-diaminobencidina (DAB, Vector Lab. Burlingame, CA USA). Al finalizar, los preparados se montaron con glicerol al 60% y se contrastaron con Hematoxilina.

La observación de los preparados histológicos se realizó en un equipo integrado por un microscopio óptico Nikon 50i, una cámara digital Nikon DSFi1 y una computadora con un programa de análisis de imágenes NIS-Elements BR, Nikon Instruments Inc. Melville, NY, USA.

4.4. Evaluación de la expresión de CYP4F2

Como se detalló en la Introducción (punto 2.1.3.1), El CYP4F2 es la isoforma del CYP con mayor actividad biológica para catalizar el metabolismo del ácido araquidónico generando 20-HETE. Por ese motivo se la ha elegido objeto de análisis en el presente estudio.

La expresión de CYP4F2 se manifestó con intensidades variables de color marrón otorgado por el cromógeno DAB en las células musculares lisas del intersticio y de los vasos arteriales, y en las células neoplásicas.

4.5. Evaluación de la microvasculatura

Para estudiar la microvasculatura en los cortes histológicos se optó por evaluar la expresión de la proteína denominada “cluster de diferenciación 31” (CD31) que corresponde a la molécula de adhesión endotelial plaquetaria PECAM-1. Esta molécula se expresa ampliamente en las uniones intercelulares endoteliales, plaquetas, neutrófilos, monocitos y macrófagos y algunas células T.

La evaluación histológica se hizo siguiendo los criterios propuestos por el Consenso Internacional sobre evaluación de la angiogénesis en tumores sólidos¹¹².

La expresión de CD31 se puso de manifiesto por el color marrón otorgado por el cromógeno DAB. En cada preparado se analizaron 5 campos de gran aumento (con lente objetivo de 40x y lente ocular de 10x). En cada campo se contaron, todas las luces con revestimiento endotelial teñido de marrón, excluyendo los vasos con músculo liso en su pared, dado que se evaluó sólo la microvasculatura, y todas las células marrones (con forma elongada) que estuviesen alineadas en el intersticio, aunque no se vinculasen con luces vasculares. Frente

a una bifurcación vascular se contó cada una de las ramificaciones. Se excluyeron del conteo, células que pudiesen haberse teñido de marrón pero que no son de interés para este estudio, como eritrocitos, neutrófilos y macrófagos y depósitos indeseados de precipitación de cromógeno marrón.

4.6. Evaluación de la proliferación celular

La proliferación celular se evaluó mediante la reacción de Feulgen o de Feulgen – Rosembeck. Se trata de una técnica específica para la tinción de ADN, pues depende del azúcar desoxirribosa.

Tras una hidrólisis ligera, se logra la extracción del ARN y la desintegración de la unión desoxirribosa - purina, con liberación de grupos aldehídos, sobre los cuales actúa el reactivo de Schiff (fucsina básica decolorada con anhídrido sulfuroso). Se obtiene un color púrpura o violeta oscuro en las estructuras que contienen ADN, proporcional a su concentración. Se demuestra así la ubicación del ADN en la cromatina de núcleos interfásicos, en cromosomas durante la mitosis, y muy pequeña cantidad en mitocondrias.

Durante la metafase la cromatina se encuentra en su máximo nivel de compactación, en forma de cromosomas metafásicos, que se alinean en el ecuador de la célula, mientras que, en la anafase, las dos cromátidas que conforman a cada cromosoma son separadas y conducidas por el huso mitótico hacia los polos.

Los preparados fueron observados a través del microscopio, se contaron las mitosis que presentaron coloración violácea discernible en cromátides y cromosomas dependiendo de la fase que se encontraban. El recuento mitótico nos permitió observar cuantas células se

encontraban en división celular. La observación de los preparados histológicos se realizó en un equipo integrado por un microscopio óptico Nikon 50i, una cámara digital Nikon DSFi1 y una computadora con un programa de análisis de imágenes NIS-Elements BR (Nikon Instruments Inc. Melville, NY, USA). Para la cuantificación se contaron todas las figuras mitóticas observadas en 6 campos al azar, utilizando el lente objetivo de 40X y lente ocular de 10x. En su mayoría correspondieron a metafases y anafases. Los resultados se expresaron como porcentaje de número de mitosis por campo.

5. Inmunodetección de proteínas – Western Blot

Los tumores que fueron guardados -80° C en seco fueron procesados para la obtención de homogenatos totales. Se colocaron 150 de μL de buffer de lisis (Tris base 10 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100[®] 1%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) 1 mM, pirofosfato de sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10(\text{H}_2\text{O})$) 10 mM, ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) 10 mM, y fluoruro de sodio (NaF) 100 mM, enriquecido con un cóctel comercial de inhibidores de proteasas (cOmplete[™], Mini, EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim; Alemania). Con ayuda de un homogeneizador de tejidos se destruyeron todas las estructuras. Las muestras fueron incubadas a 4°C y se realizó una centrifugación a 12000 xg para separar todo el material que no fue lisado. Para cada una de las muestras se preparó una dilución 1/5 y se midieron las concentraciones proteicas de cada dilución utilizando el método de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA; EE. UU).

La separación de proteínas se realizó mediante una electroforesis vertical en gel desnaturizante de poliacrilamida utilizando un equipo Mini Protean[®] Tetra Vertical

Electrophoresis Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA; EE. UU). Se utilizaron geles a una concentración de poliacrilamida del 10 %, para conseguir una separación en el rango de 120 a 28 kDa, donde se encuentran comprendidas las proteínas de interés. Se sembraron 50 µg de proteína por calle. Las muestras fueron disueltas en buffer de siembra (Tris base 250 mM; SDS 8%; Glicerol 40%; β-mercaptoetanol 10% con 10 uL de azul de bromofenol 0,001%. La composición de la alícuota de siembra fue: muestra 75% y buffer de siembra 25%, y la separación electroforética se realizó a corriente constante de 150 V.

Una vez separadas las proteínas, el gel fue transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF, por sus siglas en inglés) (100 V, 70 min). La membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5 % en TBS-T 0.1 % (1 h, TA), luego se incubó con un primer anticuerpo específico para la proteína de interés (16 h, 4º C), RA (ID#sc7305, 1/750, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), CYP4F2 (ID#ab50669, 1/400, Abcam, Cambridge, UK). Se realizaron lavados con TBS-T 0,1 % (3 x 5min) y se incubó con un segundo anticuerpo con especificidad de especie para el primer anticuerpo conjugado a la enzima HRP (del inglés, horseradish peroxidase) (anti-conejo (ID#7074S, 1/10000, Cell Signaling Technology; o anti-ratón (ID#NA931VS, 1/6500, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), (2 h, TA), después de lo cual se repitieron los lavados con TBS-T 0.1 % (3 x 10min). Todas las incubaciones fueron realizadas con agitación utilizando un agitador orbital marca DragonLab (Distrito Shunyi, Beijing, China).

Para el revelado por quimioluminiscencia se utilizó el sistema Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Lifescience, Pittsburgh, PA, USA). La luminiscencia se reveló en películas fotográficas CL-XPosure Films® (Thermo Scientific,

Rockford, IL; EE. UU) y las bandas se cuantificaron utilizando el software ImageJ FIJI: (GNU General Public License, Website: <https://fiji.sc/>).

En todos los casos, las membranas se “strippearon”, se volvieron a bloquear con leche 5 % en TBS-T 0.1 % y se incubaron con un primer anticuerpo específico para una proteína de control de carga, GAPDH (ID#MAB374, 1/1000, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

6. Análisis estadístico de los datos

El ajuste de los datos a una distribución normal se analizó utilizando el test de Shapiro-Wilks. Para la comparación de las curvas de crecimiento tumoral se utilizó el análisis de ANOVA de dos vías para muestras repetidas en el tiempo, seguido de la corrección post-hoc de Tukey. En el resto de los casos se utilizó el test de Student de dos colas para la comparación de dos condiciones y el análisis de ANOVA de una vía seguido de la corrección post-hoc de Tukey para las comparaciones múltiples. En todos los casos se consideró como significativa una $p < 0,05$.

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

CAPITULO IV

4. RESULTADOS

4.1. Desarrollo del modelo animal. Estudios preliminares

En base a la experiencia del laboratorio en otros modelos animales, a los antecedentes bibliográficos citados en la TABLA 1, y a fin de optimizar el modelo experimental, se ensayaron distintas alternativas para las siguientes variables: número de células inyectadas, sitio de inyección y vehículo utilizado.

4.1.1. *Número de células inyectadas*

En primera instancia se inyectaron tres animales/grupo por vía subcutánea (s.c.) en el flanco dorsal derecho con 2.5×10^6 , 5×10^6 y 7×10^6 células en suspensión en medio 2x. Luego de diez semanas no se observó desarrollo tumoral en ninguno de los ratones inyectados con $2,5 \times 10^6$ o con 7×10^6 células. En cambio, entre las semanas cuatro y cinco se observó un botón tumoral en dos de los tres ratones inyectados con 5×10^6 células, y en la semana doce surgió el tercer tumor. El volumen máximo de los tumores se alcanzó entre los días 60 -113 luego de la aparición del botón tumoral y fue de $1027,2 \pm 112,7 \text{ mm}^3$.

En las pruebas subsiguientes se utilizaron 5×10^6 células por ratón.

4.1.2. *Sitio de inyección*

Debido a la variabilidad en los tiempos de latencia a la aparición del tumor y de llegada al volumen máximo observada en el primer experimento, se ensayó otro sitio de inyección. Se inyectaron 5×10^6 células resuspendidas en Medio 2x en dos animales por vía s.c. en el pliegue nugal y en dos animales en el flanco dorsal derecho. Transcurridas cuatro semanas no se observó botón tumoral en los animales inyectados en el pliegue nugal, observándose en cambio desarrollo tumoral en uno de los animales inyectados en el flanco dorsal, con una latencia de 31 días y un volumen máximo de $1295,6 \text{ mm}^3$ alcanzado 22 días luego de la aparición del botón tumoral. De aquí en más se usó el flanco dorsal derecho como sitio de inyección.

4.1.3. *Vehículo utilizado*

A fin de optimizar la respuesta de formación tumoral, se analizó el impacto de modificar el medio de resuspensión celular. Se inyectaron células resuspendidas en medio 2x o en Matrigel en dos grupos en paralelo de seis animales/grupo.

La incidencia de aparición de tumor en el grupo “Medio 2x” fue de 2/6. En cambio, en el grupo “Matrigel” la incidencia de aparición fue de 6/6 con un tiempo máximo de latencia de 8 semanas y un volumen tumoral máximo de $999.4 \pm 191.2 \text{ mm}^3$, 26 días luego de la aparición del botón tumoral.

A partir de los experimentos preliminares descriptos, se estableció el modelo animal por inyección s.c. en el flanco dorsal derecho de 5×10^6 células LNCaP resuspendidas en Matrigel.

4.2. Efecto de la depleción de andrógenos y de la inhibición sistémica de la síntesis del 20-HETE sobre las características de los tumores generados por células LNCaP.

4.2.1. *Crecimiento tumoral*

En concordancia con los experimentos preliminares, la inyección s.c de 5×10^6 células LNCaP en flanco dorsal derecho, generó la aparición de los primeros tumores a partir de las 4 - 5 semanas. Una vez alcanzado un volumen aproximado de 100-150 mm³, alrededor de una semana luego de la aparición del botón tumoral, se los asignó azarosamente a los diferentes grupos:

Grupo A: Controles (Intactos, inyectados con vehículo)

Grupo B: Castración quirúrgica (QX)

Grupo C: Tratados con HET0016 (HET0016, inhibición de la síntesis de 20-HETE)

Grupo D: Castrados y tratados con HET0016 (QX + HET0016)

Los animales no mostraron variación intergrupala de peso y los valores correspondieron al desarrollo normal de la especie. Tampoco se observaron signos conductuales alterados, de acuerdo con los indicadores de bienestar animal utilizados en nuestro bioterio, tales como signos de dolor o estrés específicos de la especie.

La efectividad de la castración quirúrgica se verificó mediante la determinación de los valores de testosterona sérica. El nivel de testosterona fue de $0,62 \pm 0,01$ ng/ml (n=3) en los

animales intactos, y resultó menor a los niveles detectables en los animales castrados (n=3). Por otro lado, la efectividad del tratamiento con HET0016 se corroboró mediante la medida del contenido hepático de 20-HETE. Este resultó significativamente menor en los animales tratados respecto de los controles (en pg 20-HETE/mg proteína: control: 3190 ± 1293 ; HET0016: 388 ± 102 , n=3, $p < 0,01$).

La Figura 8 muestra el curso temporal del crecimiento tumoral en los diferentes grupos. El momento de la castración o del inicio del tratamiento se indica como “tiempo 0” y nos referiremos a él como “intervención”. En el caso del grupo control se registró un crecimiento tumoral sostenido. En cambio, el volumen tumoral resultó significativamente menor al control a partir de la segunda o tercer medida post intervención para todos los grupos ($p < 0,001$). En los grupos HET0016 y QX, la pendiente de crecimiento tumoral se asemejó al control entre los días siete y catorce aproximadamente, a partir de entonces la velocidad de crecimiento se vio reducida. Los animales fueron sacrificados una vez alcanzado el volumen tumoral previsto para el punto final. En cambio, la tasa de crecimiento tumoral fue sostenidamente menor en el grupo QX+HET0016, hasta el día nueve. Con la excepción de un repunte transitorio entre los días nueve - dieciséis, la tasa de crecimiento permaneció baja hasta el sacrificio de los animales. Sin embargo, aún entre los días nueve-dieciséis el volumen tumoral resultó significativamente menor a los grupos QX o HET0016 ($p < 0,01$ vs ambos).

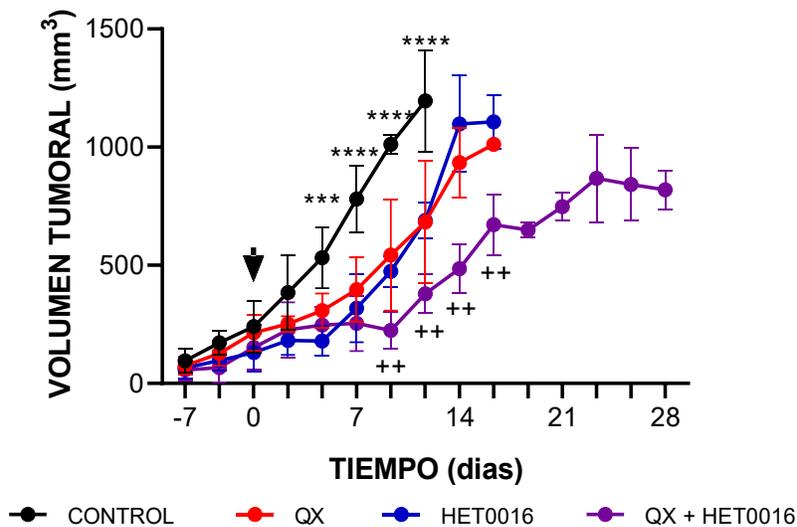


Figura 8. *Curso temporal del crecimiento tumoral en ratones.* Los tumores fueron generados por la inyección s.c. de una suspensión de células LNCaP (5×10^6 en Matrigel) en ratones macho NIH(S)Fox1N^{nu/nu} de 4-5 semanas. Se asignó los animales a cuatro grupos: controles (negro), castrados (QX, rojo), tratados con HET0016 (HET0016, 5 mg/kg/día, azul) y castrados - tratados (QX+HET0016, violeta) (n=5/ grupo). El momento de la castración y/o el comienzo de tratamiento se indican con la flecha. Los valores se expresan como la media \pm SEM. (***) $P < 0,001$, (****) $P < 0.0001$ vs. cualquier otro grupo; ++ $P < 0,01$ vs QX o HET0016).

4.2.2. Características de los tumores recolectados

4.2.2.1. Expresión del CYP4F2

Una vez establecido el modelo experimental, se verificó en primera instancia la expresión del CYP4F2 en los tumores generados (Figura 9). Como se especificó en la Introducción, el CYP4F2 es una 20-hidroxilasa de alta actividad catalítica en la síntesis del 20-HETE. La tinción inmunohistoquímica confirmó que todas las muestras estudiadas tuvieron expresión del CYP4F2 (tinción amarronada) en el citoplasma celular. En el grupo QX la positividad resultó

irregular en distintas áreas del preparado, mientras que la inmupositividad fue aparentemente más suave en el grupo QX+HET0016. Esta observación fue confirmada posteriormente por western blot (punto 4.2.2.6.).

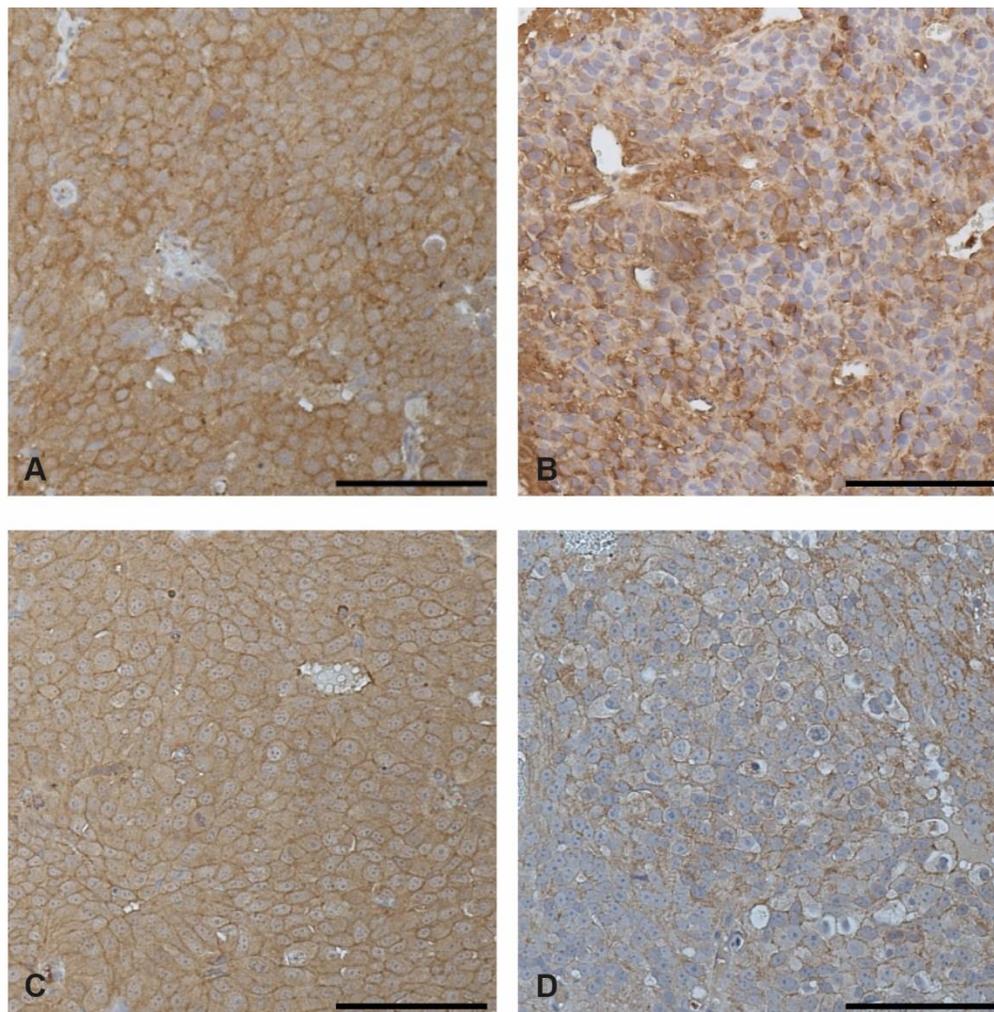


Figura 9. *Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CYP4F2.* Se muestran microfotografías representativas de la marcación inmunohistoquímica para CYP4F2, en muestras de tumores murinos de los grupos control (CTRL), castración quirúrgica (QX), tratados con HET0016 (HET0016) y castrados - tratados (QX+HET0016). Barra de escala=100 μm.

4.2.2.2. Volumen tumoral final

El volumen tumoral resultó menor al control en todos los grupos tratados (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $P < 0.0001$ para los grupos HET0016, QX y QX+HET0016 respectivamente) (Figura 10). Además, es digna de resaltar la diferencia en el volumen tumoral del grupo QX+HET0016 respecto de los dos tratamientos por separado (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. QX y HET0016 respectivamente). En la Figura 10 se muestran tumores representativos de cada grupo, y el análisis cuantitativo del tamaño tumoral final.

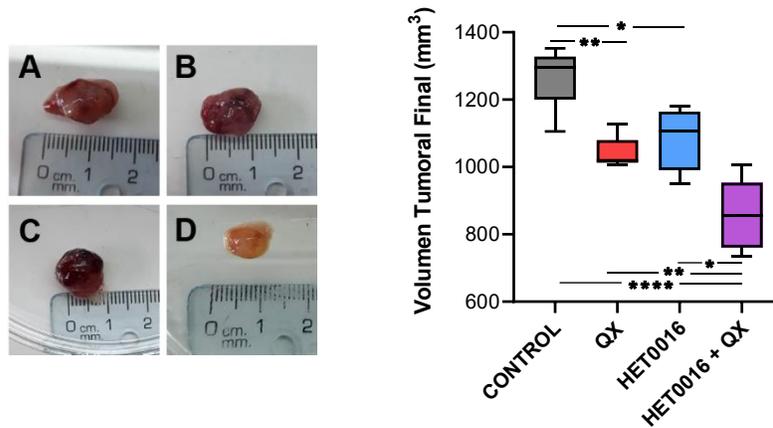


Figura 10. Fotografía representativa de tumores obtenidos de ratones de los diferentes grupos experimentales y análisis del tamaño tumoral final. A) control (gris, n=5), B) Castrado (QX, n=5 rojo), C) tratado con HET0016 (azul, n=5), y D) Castrado-tratado con HET0016 (HET0016 + QX, n=5 violeta). Los valores se expresan como la media \pm SEM. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $P < 0.0001$).

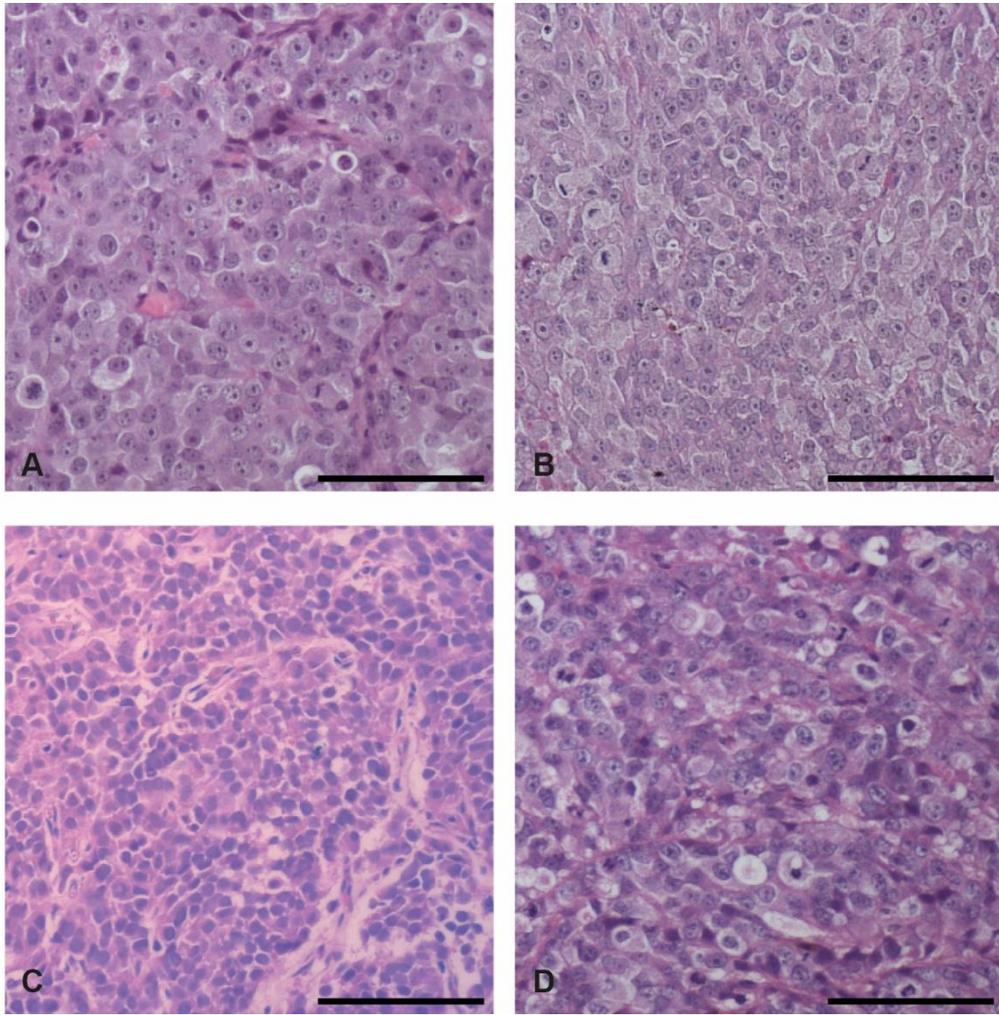


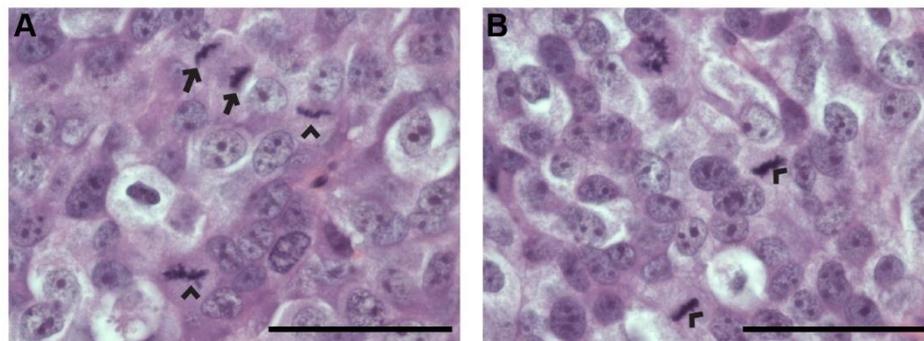
Figura 11. Microfotografías representativas de la tinción H&E de cortes de tumores de los distintos grupos experimentales. A. control, B. Castración quirúrgica, C. Tratamiento con HET0016, D. Castración quirúrgica y Tratamiento con HET0016. Barra de escala = 100 μ m.

El examen histológico de los preparados reveló una arquitectura tumoral conservada, formados por células poliédricas y vascularización evidente en todos los grupos. Como se observa en la Figura 11 A-C, los núcleos son redondeados y eucromáticos, con nucleolos evidentes. En cambio, en la Figura 11 D se observan varias células donde la cromatina del

núcleo está muy condensada, con apariencia de picnosis. En las mismas células el citoplasma aparece vacuolizado.

4.2.2.3. Proliferación celular

El índice mitótico fue utilizado como marcador de proliferación celular. Para su estimación se realizó el recuento de las figuras mitóticas en cortes teñidos con hematoxilina-eosina, y se calculó la relación de núcleos positivos/núcleos totales. Las figuras mitóticas se definieron como la presencia de extensiones de cromatina (cromosomas condensados) que se extienden desde una masa de cromatina condensada, que corresponde a una figura en metafase o telofase. La Figura 12 ilustra las figuras mitóticas observadas. En semejanza con lo observado sobre el volumen tumoral final, el índice de mitosis fue menor en todos los grupos tratados respecto del control ($p < 0,05$ para HET0016 y $p < 0,0001$ para QX y QX+HET0016).



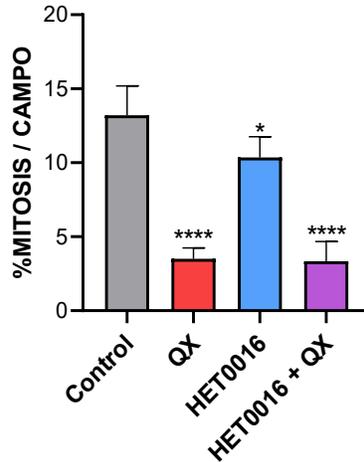


Figura 12. *Análisis de la proliferación celular en muestras de tumores murinos.* Microfotografías de los tumores recuperados con tinción de Feulgen por inmersión 100X. En las imágenes se marca: célula en Anafase (flecha), donde se observa la ubicación de los cromosomas en los polos celulares; y otras en Metafase (punta de flecha) donde los cromosomas se ubican en el plano ecuatorial. (A y B) Barra de escala = 200 μ M. Gráfico: Análisis cuantitativo del índice mitótico en cortes histológicos medidos en porcentaje de mitosis por campo (Controles (n=3), castrados (QX, n=3), tratados (HET0016, n=3), y castrados - tratados (QX+HET0016, n=4). (Anova * $p < 0,05$, **** $P < 0.0001$ vs control)

4.2.2.4. Vascularización

La vascularización tumoral se evaluó por la expresión del marcador vascular CD31, determinando en número de vasos por campo. La figura 13 A ilustra la disposición de las estructuras vasculares en los cortes observados. El análisis cuantitativo indica una disminución significativa de la vascularización respecto del control sólo en el grupo QX+HET0016 ($p < 0,01$). Es importante subrayar que el número de vasos por campo en el grupo QX+HET0016 también resultó significativamente menor al grupo QX y al grupo HET0016 ($p < 0,05$ para ambos).

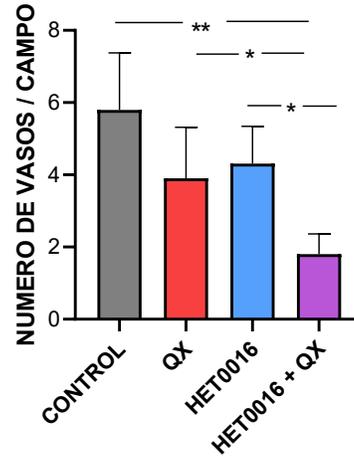
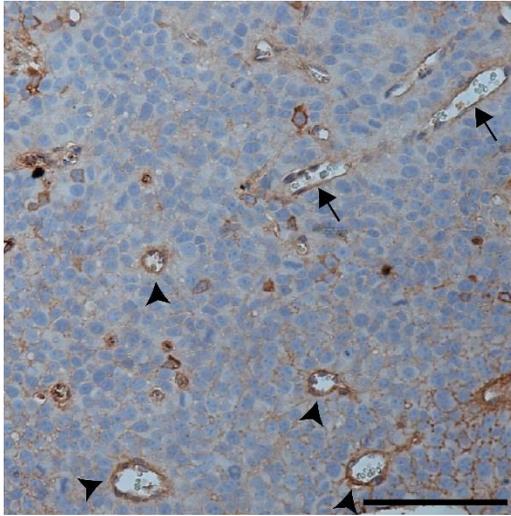


Figura 13. Análisis inmunohistoquímico de la vascularización (expresión de CD31) en muestras de tumores murinos. Microfotografía: Se señalan estructuras vasculares con marca positiva para CD31: flecha, células vasculares alineadas que marcan vasos elongados; punta de flecha, luces vasculares con revestimiento endotelial. Barra de escala = 100 μ m. Gráfico: Análisis cuantitativo de la angiogénesis tumoral expresada como número de vasos CD31+ por campo (Controles (n=4), castrados (QX, n=3), tratados con HET0016 (HET0016, n=4), y castrados - tratados (QX+HET0016, n=3). Los valores se expresan como la media \pm SEM. (* $p < 0,05$, ** $P < 0.01$).

4.2.2.5. Expresión del CYP4F2 y del RA en muestras tumorales

Como se describió en el capítulo de Introducción, los andrógenos desempeñan un papel protagónico en la progresión del cáncer de próstata (Introducción, punto 2.3.1). Por otro lado, los resultados del presente trabajo indican que la inhibición sistémica de 20-hidroxilasas *per se* aminora el crecimiento tumoral, y potencia el efecto de la ablación androgénica sobre el mismo. En base a ello, y a la relevancia de los andrógenos en el crecimiento tumoral, resultó de interés indagar si el tratamiento con HET0016 modifica la expresión de receptores de andrógenos en el tumor, y/o si recíprocamente, la castración altera la expresión tumoral del CYP4F2.

La expresión de ambas proteínas en los homogenatos tumorales fue analizada por Western blot (Figura 14 A). En concordancia con las diferencias observadas por inmunohistoquímica, la expresión del CYP4F2 (Figura 14 B) fue significativamente menor al control en los grupos QX y QX+HET0016 ($p < 0,01$ para ambos). Cabe resaltar que, si bien el tratamiento con HET0016 no modificó *per se* la expresión del CYP4F2 respecto del control, potenció el efecto inducido por la castración ($p < 0,01$ vs. QX). A su vez, la castración redujo la expresión de CYP4F2 respecto del tratamiento con HET0016 solo ($p < 0,01$ vs. HET0016).

En cuanto al RA (Figura 14 C), su expresión fue mayor en el grupo QX ($p \leq 0.0001$ vs. control), sin cambios en el grupo HET0016. Sin embargo, el efecto más relevante del tratamiento con HET0016 fue que resultó en una dramática reducción de la expresión del RA en el grupo QX+HET0016 respecto del grupo QX ($p \leq 0.0001$), aún por debajo de la expresión en el grupo control ($p \leq 0.01$).

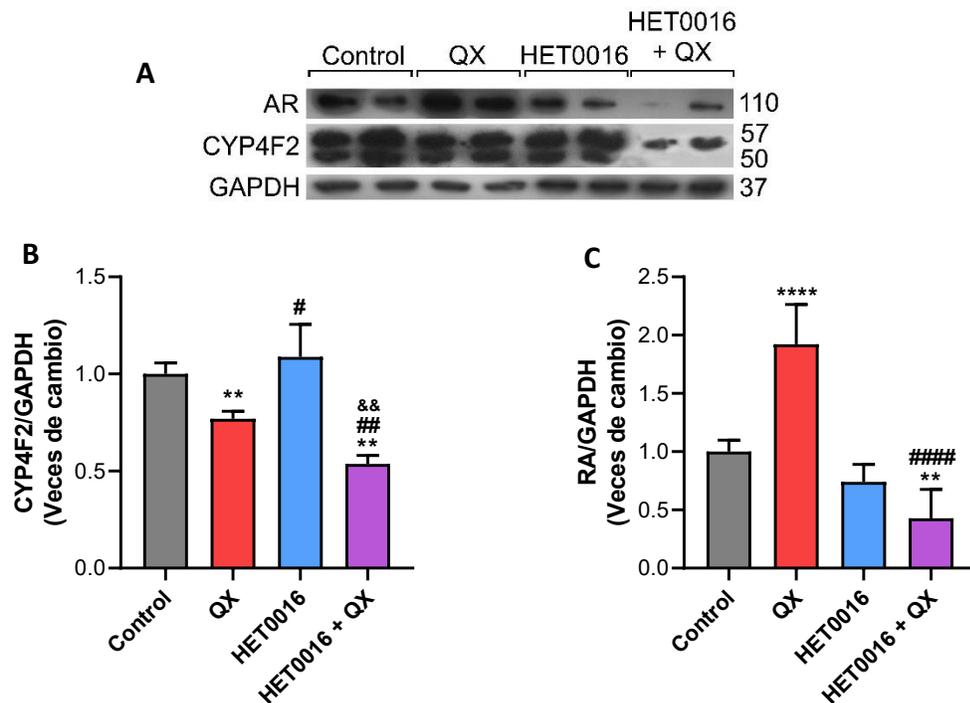


Figura 14. Expresión de CYP4F2 y del receptor de andrógenos (RA) en muestras de tumores murinos.

Se analizó la expresión proteica en homogenatos de los tumores generados por la inyección de células LNCaP en los siguientes grupos: Control, Castración quirúrgica (QX), Tratamiento con HET0016 (HET0016), y Castración quirúrgica + Tratamiento con HET0016 (QX+HET0016). **A.** Se muestra un western blot representativo para cada proteína. La expresión proteica (en unidades arbitrarias) se calculó como el cociente de CYP4F2 (B) o RA (C) sobre GAPDH. A la condición control se le asignó el valor arbitrario de 1 y todos los resultados se refirieron a ese valor como veces de cambio. (n= 4 por grupo). Los valores se expresan como la media \pm SEM. (** p<0,01, **** P<0.0001 vs control; # p<0,05, ## p<0,01, ##### P<0.0001 vs QX; && p<0,01 vs HET0016).

CAPITULO V

DISCUSIÓN

El presente trabajo describe el desarrollo de un modelo experimental murino de cáncer de próstata sensible a los andrógenos, y el resultado de la inhibición sistémica de la síntesis de 20-HETE sobre el crecimiento tumoral.

En nuestras condiciones, los tumores generados por la inyección de células LNCaP se comportaron de manera similar a lo descrito por otros autores ^{113 114}. Si bien en esos trabajos se utilizaron diferentes sitios de inyección y/o número de células por cada sitio, el tiempo de latencia a la aparición del tumor y al volumen máximo, y el volumen tumoral final coinciden en general con los resultados del presente trabajo. Asimismo, según lo esperado, en todo el proceso del desarrollo del modelo experimental, el estado general de los animales fue bueno.

En los animales intactos la tasa de crecimiento tumoral fue sostenida durante el curso del estudio. En cambio, la menor tasa de crecimiento de los tumores en animales castrados o tratados con HET0016 durante la primera semana, quedó reflejada en la menor pendiente en el gráfico del curso temporal de crecimiento tumoral (período de regresión). Sin embargo, poco tiempo después, la pendiente de crecimiento se asemejó a la del grupo control (periodo de regeneración). Se ha propuesto que la recuperación de la tasa de crecimiento tumoral en los animales castrados se debe a la transformación de al menos algunas células al fenotipo independiente de andrógenos¹⁰⁰. Este comportamiento de los

tumores generados con células LNCaP podría ser extrapolado a la situación clínica de transformación a CRPC durante la terapia de supresión hormonal⁸². Del mismo modo, la aceleración de la pendiente de crecimiento en el grupo HET0016, sugiere la adaptación de las células a esta nueva condición. En general, la capacidad adaptativa a condiciones menos favorables es una característica de la célula tumoral. En particular, la sobreexpresión del receptor GPR75 en células de cáncer de próstata en cultivo en presencia del antagonista del 20-HETE⁶⁹, podría ser parte de este mecanismo de adaptación. Resulta muy importante recalcar que, en los animales castrados, la inhibición de la síntesis de 20-HETE por el HET0016 retrasó el pasaje al periodo de regeneración y, luego de una recuperación transitoria, la tasa de crecimiento se mantuvo en la misma pendiente que en el periodo de regresión, con un volumen tumoral final significativamente menor respecto de cualquier otro grupo, a pesar de la mayor sobrevida de los animales. Puede inferirse entonces que la inhibición de la síntesis de 20-HETE en los animales castrados interfiere con la conversión al fenotipo independiente de andrógenos.

En concordancia con las observaciones de otros autores, los niveles bajos de testosterona derivados de la castración podrían explicar la reducción transitoria de la tasa de crecimiento tumoral y el menor volumen tumoral final^{81, 115, 100, 116}.

Esta disminución puede explicarse en virtud del papel crucial de los andrógenos en células LNCaP. De hecho, el RA es un factor de transcripción que se une al sitio promotor de una variedad de moléculas asociadas a la proliferación, aumentando su transcripción. Así, por ejemplo, los andrógenos aumentan la expresión de la ciclina D. La ciclina D1 actúa como reguladora de kinasas dependientes de ciclinas (del inglés, CDKs), cuya actividad es

imprescindible para la transición G1/S del ciclo celular. Este mecanismo es tan relevante que cuando las células sensibles a andrógenos se ven privadas de los mismos, evaden el ciclo celular y quedan arrestadas en G0⁷⁹. Así, en acuerdo con la literatura¹⁰⁰, en nuestros animales, el índice mitótico fue sustancialmente menor en los tumores de animales castrados. El tratamiento con HET0016 de los animales QX no resultó en una reducción adicional del índice mitótico, probablemente debido al efecto drástico de la deprivación androgénica *per se*.

Como ya mencionamos, en concordancia con lo observado por otros autores en diversos tipos tumorales, el tratamiento con HET0016 enlenteció transitoriamente el crecimiento y redujo el volumen tumoral final^{53,117,118}. Podríamos especular que esta respuesta está asociada al menor índice mitótico observado en los tumores de animales tratados con HET0016, que podría interpretarse a su vez a la luz del efecto proliferativo descrito para el 20-HETE *in vitro*⁸.

En cambio, en nuestro modelo experimental, la vascularización del tumor no se vio significativamente afectada por la castración ni por la inhibición de la síntesis de 20-HETE individualmente. Este último resultado difiere del efecto anti angiogénico del HET0016 observado en otros modelos tumorales^{117, 118}. La angiogénesis es un proceso sumamente complejo del que participan numerosos factores. Por lo tanto, sin desestimar los efectos proangiogénicos del 20-HETE descritos en la introducción (punto 2.2.3.1), podría interpretarse que otros factores proangiogénicos tales como el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2) o el VEGF podrían compensar *in vivo* el efecto de la ausencia de 20-HETE en nuestro modelo experimental. Sin embargo, la combinación de depleción

androgénica e inhibición de la síntesis de 20-HETE en los animales QX+HET0016 produjo una importante reducción de la vascularización tumoral. Si bien de nuestros resultados no puede inferirse el mecanismo de esta interacción, podemos hipotetizar que la menor vascularización tumoral podría contribuir al menor crecimiento y volumen final de los tumores en este grupo. Finalmente, a pesar de que la presente tesis no aporta evidencias experimentales directas al respecto, podríamos especular que el tratamiento con HET0016 de animales QX podría suprimir, al menos parcialmente, el efecto antiapoptótico del 20-HETE (ver introducción, punto 2.2.3.2). Esta especulación surge a partir del mayor número de células vacuoladas con núcleo picnótico o fragmentado, característicos de células en apoptosis, observadas en los preparados de animales QX+HET0016.

Estudios previos *in vitro* revelaron el efecto positivo del 20-HETE sintetizado por las células LNCaP en la sobrevivencia celular⁸. Los resultados de la presente tesis extienden esas observaciones a la condición *in vivo*. En este escenario, las células tumorales están alojadas en la matriz extracelular; esta interacción les proporciona no solo el soporte histológico, sino también señales químicas, originadas por otros componentes del microambiente tumoral, que resultan propicias para su desarrollo. De esta forma, el tratamiento sistémico con HET0016 no inhibió selectivamente la síntesis de 20-HETE en la célula tumoral, sino también el aporte de otros tipos celulares, tales como las células endoteliales, células inflamatorias que infiltran la masa tumoral, u otros tipos celulares que conforman el estroma tumoral. En su conjunto, estos hallazgos destacan al 20-HETE como una molécula clave en el crecimiento tumoral.

La menor expresión del CYP4F2 en tumores de animales castrados, concuerda con la mayor expresión del CYP4F2 observada previamente en células LNCaP incubadas con DHT⁸. La expresión del CYP4F2 en el humano está bajo la regulación de la Proteína de Unión al Elemento Regulatorio por Esteroles (del inglés, SREBP-1). Los andrógenos promueven la síntesis y activación de SREBP-1 que, una vez activado, transloca al núcleo donde interactúa con el promotor del CYP4F2 induciendo su transcripción³⁰. Podría hipotetizarse entonces que la depleción androgénica originaría una menor disponibilidad de SREBP activado derivando en una menor expresión de CYP4F2. Si bien no podemos proponer un mecanismo para explicar la mayor inhibición de la expresión de CYP4F2 en el grupo QX+HET0016, podemos especular que la menor disponibilidad de 20-HETE en estos tumores podría justificar al menos parcialmente nuestros hallazgos respecto del crecimiento y tamaño tumoral, proliferación y vascularización.

Por otro lado, la sobreexpresión del RA, observada en tumores de nuestros animales castrados, una aberración ya caracterizada en el CPRC en humanos, es considerada un mecanismo de adaptación a la escasez de andrógenos en el microambiente y, por ende, un mecanismo de resistencia a la castración¹¹⁹. Un aumento en la expresión del RA fue observado también por otros autores en tumores generados por células LNCaP en animales castrados^{116, 120}. El tratamiento con HET0016 no solo previno la mayor expresión del RA en animales castrados (grupo QX + HET0016) sino que redujo la expresión del RA en este grupo respecto del control. Si bien no podemos especular un mecanismo para esta interacción, este resultado *in vivo* concuerda con hallazgos previos *in vitro* en células LNCaP⁸. En esos experimentos, la incubación con HET0016 redujo la expresión del RA a nivel RNAm y

proteína, así como también la secreción al medio del PSA. Así, podríamos especular que la anulación de la sobreexpresión del RA en los animales QX +HET0016 podría asociarse a una menor transcripción de una serie de genes vinculados a la progresión de la enfermedad.

De esta forma, la menor expresión de RA, en combinación con el menor crecimiento, índice mitótico y vascularización observados en los animales QX+HET0016, sugeriría que la inhibición de la síntesis de 20-HETE actúa de forma sinérgica con la depleción androgénica interfiriendo en el desarrollo tumoral en el modelo murino de cáncer de próstata estudiado en el presente trabajo de tesis.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis se ha evaluado *in vivo* el efecto de la inhibición de la síntesis de 20-HETE sobre el desarrollo tumoral en un modelo murino de cáncer de próstata hormono dependiente. Este trabajo se desarrolló en el marco de una línea de investigación del laboratorio de Eicosanoides del Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” que plantea explorar la participación del 20-HETE en procesos que determinan la progresión del cáncer de próstata.

De los resultados del presente trabajo se desprende que el 20-HETE desempeña un papel importante en el crecimiento tumoral. El hecho de que la tasa de crecimiento y el volumen tumoral final resultaron menores en los animales castrados y tratados con HET0016 respecto de cualquiera de los tratamientos en forma independiente, sugiere un efecto cooperativo entre el 20-HETE y los andrógenos en el desarrollo tumoral. Tal interacción pudo percibirse también respecto de la proliferación y la vascularización de los tumores, en función de la drástica disminución de estos parámetros en los animales QX+HET0016.

Finalmente, el hecho de que la combinación de ambos tratamientos haya revertido la sobreexpresión del RA inherente a la castración, subraya la relevancia del 20-HETE en el desarrollo del tumor. Debido a que la expresión de una amplia variedad de genes asociados a la proliferación y la angiogénesis está bajo regulación del RA, esta última observación es clave para la interpretación del menor desarrollo tumoral en los animales QX+HET0016.

De esta manera, el presente trabajo aporta herramientas para posicionar al 20-HETE como un partícipe en el desarrollo del cáncer de próstata. Los resultados aquí presentados abren

la posibilidad de interferir en un futuro con su síntesis como una posible herramienta terapéutica, en particular en asociación en terapias de depleción androgénica.

BIBLIOGRAFIA

1. Chang AJ, Autio KA, Roach M, Scher HI. High-risk prostate cancer-Classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(6):308-323. doi:10.1038/nrclinonc.2014.68
2. Datta K, Muders M, Zhang H, Tindall DJ. Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. *Futur Oncol*. 2010;6(5):823-836. doi:10.2217/fon.10.33
3. Borin TF, Zuccari DAPC, Jardim-Perassi B V., et al. HET0016, a selective inhibitor of 20-HETE synthesis, decreases pro-angiogenic factors and inhibits growth of triple negative breast cancer in mice. *PLoS One*. 2014;9(12):e116247. doi:10.1371/journal.pone.0116247
4. Alexanian A, Rufanova VA, Miller B, Flasch A, Roman RJ, Sorokin A. Down-regulation of 20-HETE synthesis and signaling inhibits renal adenocarcinoma cell proliferation and tumor growth. *Anticancer Res*. 2009;29(10):3819-3824.
5. Colombero C, Papademetrio D, Sacca P, Mormandi E, Alvarez E, Nowicki S. Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (20-HETE) in Androgen-Mediated Cell Viability in Prostate Cancer Cells. *Horm Cancer*. 2017;8(4):243-256. doi:10.1007/s12672-017-0299-0
6. Borin TF, Zuccari D a. PC, Jardim-Perassi B V., et al. HET0016, a Selective Inhibitor of 20-HETE Synthesis, Decreases Pro-Angiogenic Factors and Inhibits Growth of Triple Negative Breast Cancer in Mice. *PLoS One*. 2014;9(12):e116247. doi:10.1371/journal.pone.0116247
7. Crona D, Whang Y. Androgen Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms Involved in Prostate Cancer Therapy Resistance. *Cancers (Basel)*. 2017;9(12):67. doi:10.3390/cancers9060067
8. Alexanian A. Targeting 20-HETE producing enzymes in cancer – rationale , pharmacology , and clinical potential. 2013;6:243-255.
9. Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J Adv Res*. 2018;11:23-32. doi:10.1016/j.jare.2018.03.005

10. Wang B, Wu L, Chen J, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):94. doi:10.1038/s41392-020-00443-w
11. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science (80-).* 2001;294(5548):1871-1875. doi:10.1126/science.294.5548.1871
12. Chacos N, Capdevila J, Falck JR, et al. The reaction of arachidonic acid epoxides (epoxyeicosatrienoic acids) with a cytosolic epoxide hydrolase. *Arch Biochem Biophys.* 1983;223(2):639-648.
13. Capdevila JH, Harris RC, Falck JR. Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(5):780-789.
14. Capdevila J, Chacos N, Werringloer J, Prough RA, Estabrook RW. Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(9):5362-5366.
15. Capdevila J, Marnett LJ, Chacos N, Prough RA, Estabrook RW. Cytochrome P-450-dependent oxygenation of arachidonic acid to hydroxyicosatetraenoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(3):767-770.
16. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1612):20120431. doi:10.1098/rstb.2012.0431
17. Panigrahy D, Kaipainen A, Greene ER, Huang S. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* Published online 2010:723-735. doi:10.1007/s10555-010-9264-x
18. Evangelista EA, Cho CW, Aliwarga T, Totah RA. Expression and Function of Eicosanoid-Producing Cytochrome P450 Enzymes in Solid Tumors. *Front Pharmacol.* 2020;11:828. doi:10.3389/fphar.2020.00828

19. Hardwick JP. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem Pharmacol.* 2008;15(75):2263-2275. doi:10.1016/j.bcp.2008.03.004
20. Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res.* 2000;41(2):163-168.
21. Powell PK, Wolf I, Jin R, Lasker JM. Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285(3):1327-1336.
22. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):131-185. doi:10.1152/physrev.00021.2001
23. Edson KZ, Rettie AE. CYP4 enzymes as potential drug targets: focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω -hydroxylase activities. *Curr Top Med Chem.* 2013;13(12):1429-1440. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
24. Stec DE, Flasch A, Roman RJ, White JA. Distribution of cytochrome P-450 4A and 4F isoforms along the nephron in mice. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2003;284(1 53-1):95-102. doi:10.1152/ajprenal.00132.2002
25. Miyata N, Roman RJ. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res.* 2005;41(4):175-193. doi:10.1540/jsmr.41.175
26. Johnson AL, Edson KZ, Totah RA, Rettie AE. Cytochrome P450 ω -Hydroxylases in Inflammation and Cancer. In: *Advances in Pharmacology.* Vol 74. ; 2015:223-262. doi:10.1016/bs.apha.2015.05.002
27. Savas U, Hsu M-H, Johnson EF. Differential regulation of human CYP4A genes by peroxisome

- proliferators and dexamethasone. *Arch Biochem Biophys*. 2003;409(1):212-220.
28. Stec DE, Flasch A, Roman RJ, White JA. Distribution of cytochrome P-450 4A and 4F isoforms along the nephron in mice. *Am J Physiol Physiol*. 2015;284(1):F95-F102. doi:10.1152/ajprenal.00132.2002
29. Hsu M-H, Savas U, Griffin KJ, Johnson EF. Regulation of human cytochrome P450 4F2 expression by sterol regulatory element-binding protein and lovastatin. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5225-5236. doi:10.1074/jbc.M608176200
30. Tang X, Chen S. Epigenetic Regulation of Cytochrome P450 Enzymes and Clinical Implication. *Curr Drug Metab*. 2015;16(2):86-96. doi:10.2174/138920021602150713114159
31. Wu, Cheng ChiaWu, C. C., Schwartzman ML. The role of 20-HETE in androgen-mediated hypertension. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. Published online 2011:45-53. doi:10.1016/j.prostaglandins.2011.06.006
32. Strömstedt M, Hayashi S, Zaphiropoulos PG, Gustafsson JA. Cloning and characterization of a novel member of the cytochrome P450 subfamily IVA in rat prostate. *DNA Cell Biol*. 1990;9(8):569-577.
33. Carroll MA, Balazy M, Huang DD, Rybalova S, Falck JR, Mcgiff JC. Cytochrome P450-derived renal HETEs: Storage and release. *Kidney Int*. 1997;51(6):1696-1702. doi:10.1038/ki.1997.234
34. Chen P, Guo M, Wygle D, et al. Inhibitors of Cytochrome P450 4A Suppress Angiogenic Responses. 2005;166(2):615-624.
35. Garcia V, Gilani A, Shkolnik B, et al. 20-HETE Signals Through G-Protein-Coupled Receptor GPR75 (Gq) to Affect Vascular Function and Trigger Hypertension. *Circ Res*. 2017;120(11):1776-1788. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.310525
36. Pascale J V., Park EJ, Adebessin AM, Falck JR, Schwartzman ML, Garcia V. *Uncovering the*

Signalling, Structure and Function of the 20-HETE-GPR75 Pairing: Identifying the Chemokine CCL5 as a Negative Regulator of GPR75. Vol 178.; 2021. doi:10.1111/bph.15525

37. Fan F, Roman RJ. GPR75 Identified as the First 20-HETE Receptor: A Chemokine Receptor Adopted by a New Family. *Circ Res*. 2017;120(11):1696-1698. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311022
38. Nowicki S, Chen SL, Aizman O, et al. 20-Hydroxyeicosa-tetraenoic acid (20 HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of rat renal Na⁺,K⁺-ATPase. *J Clin Invest*. 1997;99(6):1224-1230. doi:10.1172/JCI119279
39. Waldman M, Peterson SJ, Arad M, Hochhauser E. The role of 20-HETE in cardiovascular diseases and its risk factors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. Published online 2016:108-117. doi:10.1016/j.prostaglandins.2016.05.007
40. Clark AG, Vignjevic DM. ScienceDirect Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*. 36:13-22. doi:10.1016/j.ceb.2015.06.004
41. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(5):1016–1036.
42. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):46-54. doi:10.1038/35094059
43. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863(6):1238-1260. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.02.016
44. Amaral SL, Maier KG, Schippers DN, Roman RJ, Greene AS. CYP4A metabolites of arachidonic acid and VEGF are mediators of skeletal muscle angiogenesis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2003;284(5):1528-1535.
45. Yoder MC. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Published online 2012. 2(7): a006692 doi:10.1101/cshperspect.a006692
46. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial

- and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001;7(11):1194-1201. doi:10.1038/nm1101-1194
47. Guo AM, Janic B, Sheng J, et al. The cytochrome P450 4A/F-20-hydroxyeicosatetraenoic acid system: A regulator of endothelial precursor cells derived from human umbilical cord blood (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2011) 338, (421-429)). *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(2):490. doi:10.1124/jpet.111.179036.sociated
48. Chen L, Ackerman R, Saleh M, et al. 20-HETE Regulates the Angiogenic Functions of Human Endothelial Progenitor Cells and Contributes to Angiogenesis In Vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;348(3):442-451. doi:10.1124/jpet.113.210120
49. Guo AM, Arbab AS, Falck JR, et al. Activation of vascular endothelial growth factor through reactive oxygen species mediates 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced endothelial cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(1):18-27. doi:10.1124/jpet.106.115360
50. Guo AM, Scicli G, Sheng J, Falck JC, Edwards PA, Scicli AG. 20-HETE can act as a nonhypoxic regulator of HIF-1 α in human microvascular endothelial cells. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2009;297(2):602-613. doi:10.1152/ajpheart.00874.2008
51. Yu W, Chen L, Yang YQ, et al. Cytochrome P450 ω -hydroxylase promotes angiogenesis and metastasis by upregulation of VEGF and MMP-9 in non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(3):619-629. doi:10.1007/s00280-010-1521-8
52. Yu W, Chai H, Li Y, et al. Increased expression of CYP4Z1 promotes tumor angiogenesis and growth in human breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;264(1):73-83. doi:10.1016/j.taap.2012.07.019
53. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* Published online 2007:495-516. doi:10.1080/01926230701320337
54. Medina-Ramirez CM, Goswami S, Smirnova T, et al. Apoptosis inhibitor ARC promotes breast

- tumorigenesis, metastasis, and chemoresistance. *Cancer Res.* 2011;71(24):7705-7715. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2192
55. Lodish H. *Biologia Celular y Molecular*. 7ma ed. Medica Panamericana; 2005.
56. Yang VW. The Cell Cycle. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract: Sixth Edition*. Vol 1-2. Elsevier Inc.; 2018:197-219. doi:10.1016/B978-0-12-809954-4.00008-6
57. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: Does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(11):910-916. doi:10.1038/nrm2510
58. Johnson AL, Edson KZ, Totah RA, Rettie AE. Cytochrome P450 ω -Hydroxylases in Inflammation and Cancer. In: *Advances in Pharmacology*. ; 2015:223-264. doi:10.1016/bs.apha.2015.05.002
59. Guo M, Roman RJ, Falck JR, Edwards P a, Scicli a G. Human U251 glioma cell proliferation is suppressed by HET0016 [N-hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenyl)formamidine], a selective inhibitor of CYP4A. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(2):526-533. doi:10.1124/jpet.105.088567
60. Guo AM, Sheng J, Scicli GM, et al. Expression of CYP4A1 in U251 human glioma cell induces hyperproliferative phenotype in vitro and rapidly growing tumors in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327(1):10-19. doi:10.1124/jpet.108.140889\rjpet.108.140889 [pii]
61. Guo M, Roman RJ, Fenstermacher JD, et al. 9L gliosarcoma cell proliferation and tumor growth in rats are suppressed by N-hydroxy-N'-(4-butyl-2-methylphenol) formamidine (HET0016), a selective inhibitor of CYP4A. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(1):97-108. doi:10.1124/jpet.105.097782
62. Alexanian A, Rufanova VA, Miller B, Flasch A, Roman RJ, Sorokin A. Down-regulation of 20-HETE synthesis and signaling inhibits renal adenocarcinoma cell proliferation and tumor growth. *Anticancer Res.* 2009;29(10):3819-3824.

63. Wang Z, Tang X, Li Y, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibits the apoptotic responses in pulmonary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2008;588(1):9-17. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.045
64. Dhanasekaran A, Bodiga S, Gruenloh S, et al. 20-HETE increases survival and decreases apoptosis in pulmonary arteries and pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2009;296(3):777-786. doi:10.1152/ajpheart.01087.2008
65. Pavese JM, Farmer RL, Bergan RC. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Rev.* Published online 2010:465-482. doi:10.1007/s10555-010-9238-z
66. Borin TF, Shankar A, Angara K, et al. HET0016 decreases lung metastasis from breast cancer in immune-competent mouse model. *PLoS One.* 2017;12(6):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0178830
67. Cárdenas S, Colombero C, Panelo L, et al. GPR75 receptor mediates 20-HETE-signaling and metastatic features of androgen-insensitive prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(2):158573. doi:10.1016/j.bbalip.2019.158573
68. Perdana NR, Mochtar CA, Umbas R, Hamid ARA. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones.* 2016;48(3):228-238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27840359>
69. *Diet , Nutrition , Physical Activity and Cancer : A Global Perspective.*
70. Fujita K, Hayashi T, Matsushita M, Uemura M. Obesity , Inflammation , and Prostate Cancer. 2019;(Figure 1):1-15. doi:10.3390/jcm8020201
71. Kim JW, Ahn ST, Oh MM, Moon DG, Han K, Park HS. Incidence of Prostate Cancer according to Metabolic Health Status : a Nationwide Cohort Study. 2019;34(6):1-10.
72. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. 2018;32(17-

- 18):1105-1140. doi:10.1101/gad.315739.118.GENES
73. Shore ND, Antonarakis ES, Cookson MS, et al. Optimizing the role of androgen deprivation therapy in advanced prostate cancer : Challenges beyond the guidelines. 2020;80(6):527-544. doi:10.1002/pros.23967
74. Aaron LT, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am*. 2016;43(3):279-288. doi:10.1016/j.ucl.2016.04.012
75. Nakai Y, Nonomura N. Inflammation and prostate carcinogenesis. *Int J Urol*. 2013;20(2):150-160. doi:10.1111/j.1442-2042.2012.03101.x
76. Litvinov I V., De Marzo AM, Isaacs JT. Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(7):2972-2982. doi:10.1210/jc.2002-022038
77. Xu Y, Chen SY, Ross KN, Balk SP. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res*. Published online 2006; 66(15):7783-92 doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4472
78. Harris WP. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletionNIH Public Access. 2010;6(2):76-85. doi:10.1038/ncpuro1296.Androgen
79. Huggins C, Hodges C V. Studies on prostatic cancer i. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res*. 1941;1(4):232-240. doi:10.3322/canjclin.22.4.232
80. Labrie F. Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment. *Nat Rev Urol*. Published online 2011:73-85. doi:10.1038/nrurol.2010.231

81. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: Mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene*. 2013;32(49):5501-5511. doi:10.1038/onc.2013.206
82. Lamb AD, Massie CE, Neal DE. The transcriptional programme of the androgen receptor (AR) in prostate cancer. *BJU Int*. Published online 2014:358-366. doi:10.1111/bju.12415
83. Tso CL, McBride WH, Sun J, et al. Androgen deprivation induces selective outgrowth of aggressive hormone-refractory prostate cancer clones expressing distinct cellular and molecular properties not present in parental androgen-dependent cancer cells. *Cancer J*. 2000;6(4):220-233.
84. Locke JA, Guns ES, Lubik AA, et al. Androgen Levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6407-6415. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5997
85. Nithipatikom K, Isbell MA, See WA, Campbell WB. Elevated 12- and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in urine of patients with prostatic diseases. *Cancer Lett*. 2006;233(2):219-225. doi:10.1016/j.canlet.2005.03.025
86. Panigrahy D, Kaipainen A, Greene ER, Huang S. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):723-735. doi:10.1007/s10555-010-9264-x
87. Rocic P, Schwartzman ML. 20-HETE in the regulation of vascular and cardiac function. *Pharmacol Ther*. 2018;192:74-87. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.07.004
88. Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL. *The Mouse in Biomedical Research*. Vol 1-4.; 2007. doi:10.1016/c2013-0-10677-0
89. Zhang B, Duan Z, Zhao Y. Mouse models with human immunity and their application in biomedical research. *J Cell Mol Med*. 2009;13(6):1043-1058. doi:10.1111/j.1582-

4934.2008.00347.x

90. Shappell SB, Thomas G V., Roberts RL, et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.* 2004;64(6):2270-2305. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-0946
91. Hospital R, Dawley HS, Wycombe H. Foxn1 nu Foxn1 nu. *Lab Anim.* Published online 2002:1-9.
92. Carbone C, Maschi F. El ratón nude (nu / nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. Published online 2006:19-23.
93. Powell W, Cardiff R, Cohen M, Miller G, Roy-Burman P. Mouse Strains for Prostate Tumorigenesis Based on Genes Altered in Human Prostate Cancer. *Curr Drug Targets.* 2003;4(3):263-279. doi:10.2174/1389450033491145
94. DePinho RA. The age of cancer. *Nature.* Published online 2000:248-254. doi:10.1038/35041694
95. Zhang Q, Yang XJ, Kundu SD, et al. Blockade of transforming growth factor- β signaling in tumor-reactive CD8(+) T cells activates the antitumor immune response cycle. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(7):1733-1740. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0109
96. Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells.* 1998;16(3):166-177. doi:10.1002/stem.160166
97. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. Published online 2007:793-804. doi:10.2353/ajpath.2007.060929
98. Wang X, Gao H, Ren L, Gu J, Zhang Y, Zhang Y. Demethylation of the miR-146a promoter by 5-Aza-2'-deoxycytidine correlates with delayed progression of castration-resistant prostate

- cancer. *BMC Cancer*. 2014;14(1):308. doi:10.1186/1471-2407-14-308
99. Veldscholte J, Voorhorst-Ogink MM, Bolt-de Vries J, van Rooij HCJ, Trapman J, Mulder E. Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: High affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *BBA - Mol Cell Res*. 1990;1052(1):187-194. doi:10.1016/0167-4889(90)90075-O
100. McConkey DJ, Greene G, Pettaway CA. Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res*. 1996; ; 56 (24): 5594-9.
101. Cunningham D, You Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods*. 2015;2(1):17. doi:10.14440/jbm.2015.63
102. Animals NRC (US) C for the U of the G for the, Laboratory C and U of. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press (US); 2011. doi:10.17226/12910
103. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer*. 2010;102(11):1555-1577. doi:10.1038/sj.bjc.6605642
105. Chu TM, Murphy GP, Kawinski E, Mirand EA. Lncap model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 1983;43(4):1809-1818.
106. Yang P, Cartwright C a, Li J, et al. Arachidonic acid metabolism in human prostate cancer. *Int J Oncol*. 2012;41(4):1495-1503. doi:10.3892/ijo.2012.1588
107. Iwasa Y, Mizokami A, Miwa S, Koshida K, Namiki M. Establishment and characterization of androgen-independent human prostate cancer cell lines , LN-REC4 and LNCaP-SF , from LNCaP. Published online 2007:233-239. doi:10.1111/j.1442-2042.2007.01532.x
108. Niu YN, Wang K, Jin S, et al. The intriguing role of fibroblasts and c-Jun in the chemopreventive and therapeutic effect of finasteride on xenograft models of prostate cancer. 2016;(June 2015):1-7. doi:10.4103/1008-682X.167714

109. Sciences B. Galectin-3 Is Implicated in Tumor Progression and Resistance to Anti-androgen Drug Through Regulation of Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer. 2017;134:125-134. doi:10.21873/anticancerres.11297
110. Park F, Sweeney WE, Jia G, et al. Chronic blockade of 20-HETE synthesis reduces polycystic kidney disease in an orthologous rat model of ARPKD. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2009;296(3):575-592. doi:10.1152/AJPRENAL.90705.2008
111. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002;38(12):1564-1579. doi:10.1016/S0959-8049(02)00094-1
112. Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, et al. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res*. 1980;37:115-132.
113. Thalmann GN, Sikes RA, Wu TT, et al. LNCaP progression model of human prostate cancer: Androgen-independence and osseous metastasis. *Prostate*. 2000;44(2):91-103. doi:10.1002/1097-0045(20000701)44:2<91::AID-PROS1>3.0.CO;2-L
114. Rea D, Del Vecchio V, Palma G, et al. Mouse Models in Prostate Cancer Translational Research: From Xenograft to PDX. *Biomed Res Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/9750795
115. Jin RJ, Wang Y, Masumori N, et al. NE-10 neuroendocrine cancer promotes the LNCaP xenograft growth in castrated mice. *Cancer Res*. 2004;64(15):5489-5495. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3117
116. Yu W, Chai H, Li Y, et al. Increased expression of CYP4Z1 promotes tumor angiogenesis and growth in human breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;264(1):73-83. doi:https://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.019
117. Borin TF, Zuccari DAPC, Jardim-Perassi B V., et al. HET0016, a selective inhibitor of 20-HETE synthesis, decreases pro-angiogenic factors and inhibits growth of triple negative breast

cancer in mice. *PLoS One*. 2014;9(12):e116247. doi:10.1371/journal.pone.0116247

118. Bungaro M, Buttigliero C, Tucci M. Overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to new generation hormonal therapies in advanced prostate cancer: focus on androgen receptor independent pathways. *Cancer Drug Resist*. 2020;3(4):726-741. doi:10.20517/cdr.2020.42
119. Ehsani M, David FO, Baniahmad A. Androgen receptor-dependent mechanisms mediating drug resistance in prostate cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1534. doi:10.3390/cancers13071534

