



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

Identificación de biomarcadores asociados a la progresión del cáncer de próstata

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

Lic. Florencia Laura Cascardo

Director de tesis: **Dr. Javier Cotignola**
Consejero de estudios: **Dr. Martín Monte**

Laboratorio de Inflamación y Cáncer,
Departamento de Química Biológica,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires
IQUIBICEN-CONICET

Buenos Aires, 28 de julio de 2023

Resumen

Identificación de biomarcadores asociados a la progresión del cáncer de próstata

El cáncer de próstata es la enfermedad oncológica más diagnosticada y la tercera causa de muerte por cáncer en la población masculina de Argentina, mientras que a nivel mundial es la segunda en incidencia y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres. Presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas; cuando se encuentra localizado es mayoritariamente curable pero, al expandirse a tejidos extraglandulares, el pronóstico de cura disminuye drásticamente, teniendo a las metástasis óseas como principal causa de muerte.

Las células metastásicas de los tumores prostáticos presentan tropismo preferencial por el hueso, sitio en el cual se establecen aproximadamente el 90% de sus tumores metastásicos. Allí, las células tumorales interactúan con el microambiente óseo y provocan un desbalance en el proceso fisiológico de remodelación, que requiere una actividad perfectamente coordinada entre los osteoclastos y los osteoblastos para llevar adelante la degradación y la formación de tejido óseo de manera equilibrada. Si bien se demostró que las células óseas liberan factores que favorecen el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales prostáticas y que esa interacción, a su vez, promueve la progresión metastásica, aún no se conoce por completo la naturaleza molecular de ese diálogo entre ambos tipos celulares.

En la actualidad, a pesar de ser posible la detección temprana de los tumores prostáticos, continúa siendo un desafío poder predecir con precisión el riesgo de progresión y, por ende, determinar el tipo de tratamiento adecuado para cada paciente en particular. Al momento del diagnóstico, el predictor de referencia es la estadificación desarrollada por la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP), que se basa en la puntuación histológica de Gleason. El puntaje ISUP ofrece mejoras respecto de la puntuación de Gleason original; sin embargo, no resulta suficiente para pronosticar con certeza el curso de la enfermedad en una alta proporción de pacientes, siendo necesario encontrar nuevos biomarcadores que permitan agregar valor predictivo a los parámetros clínico-patológicos ya utilizados.

En los últimos años, cobró mayor relevancia el estudio de las vesículas extracelulares, evidenciándose que están involucradas en las diferentes etapas de la progresión tumoral. En particular, los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares pequeñas con biogénesis endocítica, que están presentes en los fluidos corporales y suelen ser un reflejo de sus células de origen. El contenido de estas vesículas incluye proteínas, lípidos, ADN y distintos ARNs. En consecuencia, los exosomas emergen como potenciales nuevos biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad a través de métodos poco invasivos como las biopsias líquidas.

Con estos antecedentes, se planteó la hipótesis que los tumores prostáticos liberan exosomas que transportan biomoléculas que acondicionan el nicho metastásico óseo. Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis fue estudiar la comunicación intercelular entre las células tumorales prostáticas y las células óseas, centrándose en la comunicación a través de vesículas similares a exosomas (ELVs, *exosome-like vesicles*), e identificar mecanismos moleculares involucrados en esta interacción intercelular.

Empleando un ensayo de co-cultivo indirecto entre células tumorales prostáticas PC3 y células precursoras óseas MC3T3 (preosteoblásticas) o Raw264.7 (preosteoclasticas), se pudo evidenciar un potencial tráfico de vesículas extracelulares desde las células PC3 hacia las células óseas. Luego, se procedió a aislar estas vesículas a partir de medios condicionados de mono-cultivos de PC3; las cuales pudieron ser caracterizadas como ELVs mediante microscopía electrónica de transmisión, citometría de flujo y Western Blot. Posteriormente, se incubaron las células precursoras óseas (MC3T3 o Raw264.7) con las vesículas aisladas de PC3, observándose cambios morfológicos y en el perfil transcripcional.

Además, se realizó un análisis bioinformático a partir de datos transcriptómicos de repositorios públicos (GSE109356, GSE117744 y GSE35813) en los que se analizó el contenido de microARNs (miRNAs) de ELVs de PC3. Se determinó cuáles eran los 100 miRNAs más abundantes en cada conjunto de datos y se identificaron los 16 miRNAs comunes a los tres conjuntos. El análisis de ontología génica de los 16 miRNAs junto con sus ARNs mensajeros (mRNAs) blanco, determinó que se encuentran asociados a inflamación, regeneración ósea, transición epitelio-mesenquimal, adhesión celular y vías de señalización en cáncer, entre otras. También se evaluó el contenido de ARNs de las ELVs derivadas de PC3 por *arrays* de expresión, focalizando el estudio en los 30 lncRNAs más abundantes, cuyos mRNAs blanco se encontraron involucrados en vías relacionadas con modificaciones de la cromatina, regulación de la transcripción y la traducción, degradación del ARN, proteólisis, diferentes tipos de uniones intercelulares, adhesión celular y procesos metabólicos, entre otros.

Por otro lado, se analizaron datos transcriptómicos de vesículas extracelulares aisladas de plasma de pacientes con cáncer de próstata y de hombres sanos (GSE71008). Al comparar la abundancia de los ARNs contenidos en las vesículas de ambos grupos, se encontraron 6 ARNs no codificantes largos (lncRNAs), 9 miRNAs y 15 mRNAs con abundancia diferencial. Además de ser candidatos interesantes a biomarcadores de diagnóstico de la enfermedad, se observó que estos ARNs están involucrados en múltiples procesos de gran importancia en el hueso, sugiriendo un rol de estas vesículas extracelulares en la preparación del nicho metastásico óseo. Para evaluar si también podrían tener utilidad como indicadores de progresión de la enfermedad, se utilizaron los datos de 482 tumores primarios de TCGA-PRAD, encontrando una firma de lncRNAs y mRNAs que presenta una asociación significativa con el tiempo de supervivencia libre de progresión de los pacientes y permite aumentar el valor predictivo del sistema de estadificación ISUP para determinar el riesgo de progresión de cada paciente.

En síntesis, este trabajo permitió ampliar el conocimiento sobre los efectos de las ELVs derivadas de células tumorales prostáticas PC3 sobre las células óseas y el rol que podrían tener en la preparación del nicho metastásico. También se identificaron perfiles de ARNs que permitirían mejorar el diagnóstico y agregar valor predictivo al parámetro de referencia utilizado para la predicción del riesgo de progresión del cáncer de próstata.

Palabras clave:

Cáncer de próstata

Metástasis ósea

Vesículas extracelulares

Exosomas

ARNs

Abstract

Identification of biomarkers associated with prostate cancer progression

Prostate cancer is the most diagnosed oncological disease and the third leading cause of cancer-related death in the Argentinian male population, while worldwide it is the second in incidence and the fifth leading cause of cancer-related death in men. It has a wide spectrum of clinical presentations; when localised it is mostly curable but, when it spreads to extraglandular tissues, cure prognosis decreases dramatically, being bone metastases the main cause of death.

Metastatic prostate cancer cells have preferential tropism for the bone, where approximately 90% of their secondary tumours are established. There, tumour cells interact with the bone microenvironment and cause a disruption in the physiological remodelling process, which requires perfectly coordinated activity between osteoclasts and osteoblasts to carry out the degradation and formation of the bone tissue in a balanced manner. Although it has been demonstrated that bone cells release factors that promote prostate tumour cells growth and survival and that this interaction, in turn, promotes metastatic progression, the molecular nature of this dialogue between the two cell types is not yet completely understood.

At the moment, despite early detection of prostate tumours being possible, it remains a challenge to accurately predict the progression risk and thus to determine the appropriate treatment for each patient. At diagnosis, the reference predictor is the staging developed by the International Society of Urological Pathology (ISUP), which is based on the histological Gleason score. It offers improvements over the original Gleason score; however, it is not sufficient to predict with certainty the course of the disease in a high proportion of patients, being necessary to find new biomarkers in order to add predictive value to the clinico-pathological parameters available.

In recent years, the study of extracellular vesicles has become more relevant, evidencing that they are involved in the different stages of tumour progression. In particular, exosomes are a type of small extracellular vesicles with endocytic biogenesis, which are present in body fluids and are usually a reflection of their cells of origin. These vesicles contain proteins, lipids, DNA and various RNAs. Consequently, exosomes emerge as potential new biomarkers for diagnosis, prognosis and monitoring of the disease through minimally invasive methods such as liquid biopsies.

Based on the hypothesis that prostate tumours release exosomes that prepare the bone metastatic niche by transporting certain biomolecules, the general aim of this thesis was to study the intercellular communication between prostate tumour cells and bone cells, focusing on the communication through exosome-like vesicles (ELVs), and to identify molecular mechanisms involved in this intercellular interaction.

Using an indirect co-culture assay between PC3 prostate tumour cells and MC3T3 (preosteoblastic) or Raw264.7 (preosteoclastic) bone precursor cells, a potential trafficking of extracellular vesicles from PC3 cells into bone cells was evidenced. These vesicles were then isolated from the conditioned medium of PC3 mono-cultures and characterised as ELVs by transmission electron microscopy, flow cytometry and Western Blot. Subsequently, bone precursor cells (MC3T3 or Raw264.7) were incubated with these PC3-derived vesicles and changes in their morphology and their transcriptional profile were observed.

Furthermore, a bioinformatics analysis was performed on transcriptomic data from public repositories (GSE109356, GSE117744 and GSE35813) in which the microRNAs (miRNAs) content of PC3-derived ELVs was analysed. The 100 most abundant miRNAs in each dataset were determined and the 16 miRNAs common to all three datasets were identified. Gene ontology analysis of the 16 miRNAs together with their target messenger RNAs (mRNAs) determined that they are associated with inflammation, bone regeneration,

epithelial-mesenchymal transition, cell adhesion and signalling pathways in cancer, among others. The RNA content of PC3-derived ELVs was also evaluated by expression arrays, focusing the study on the 30 most abundant lncRNAs, whose target mRNAs were involved in pathways related to chromatin modifications, transcription and translation regulation, RNA degradation, proteolysis, different types of intercellular junctions, cell adhesion and metabolic processes, among others.

On the other side, transcriptomic data from extracellular vesicles isolated from plasma of prostate cancer patients and healthy men (GSE71008) were analysed. By comparing the abundance of RNAs contained in the vesicles of both groups, 6 long non-coding RNAs (lncRNAs), 9 miRNAs and 15 mRNAs were found to have differential abundance. In addition to being interesting candidates for diagnostic biomarkers of the disease, these RNAs were found to be involved in multiple important processes in the bone, suggesting a role for these extracellular vesicles in the preparation of the bone metastatic niche. To assess whether they could also be useful as indicators of disease progression, we used data from 482 primary tumours from TCGA-PRAD, finding a signature of lncRNAs and mRNAs that has a significant association with progression-free survival time of patients and allows to increase the predictive value of the ISUP staging system to determine the risk of progression of each patient.

In summary, this work has broadened the knowledge about the effects of PC3 prostate tumour-derived ELVs on bone cells and the role they may play in preparing the metastatic niche. RNA profiles were also identified to improve diagnosis and add predictive value to the reference parameter used for prostate cancer progression risk prediction.

Key words:

Prostate cancer

Bone metastasis

Extracellular vesicles

Exosomes

RNAs

Agradecimientos

Me resulta muy difícil poner en palabras lo afortunada y agradecida que me siento. Hacer un doctorado es una tarea sumamente desafiante, tanto en lo profesional como en lo personal, por lo que tener un entorno que acompañe es fundamental. Cualquier cosa que pueda decir queda chica pero, dado que este logro no es solo mío, les dedico unas líneas a todos aquellos que de una u otra forma colaboraron para que sea posible.

Le agradezco muy profundamente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, mi segundo hogar durante más de diez años, por la gran formación recibida durante mis estudios de grado y posgrado y por ser un ejemplo de educación pública, gratuita y laica de calidad. A una gran parte de la comunidad de Exactas, por hacer de ella un lugar especial, por abrirme la cabeza, enseñarme a valorar el pensamiento crítico por sobre todas las cosas y por pregonar la importancia de militar por otra ciencia que no se rinda ante el modelo reinante de mercantilización del todo.

A la Universidad de Buenos Aires y The Company of Biologists por haber contribuido a través de becas para que pueda llevar adelante mi proyecto doctoral y realizar una estadía de investigación en el exterior.

A mi consejero de estudios, el Dr. Martín Monte, por su acompañamiento y su excelente predisposición para ayudarme con lo que necesitara durante las distintas etapas de la tesis. A los Dres. Ezequiel Lacunza y Carlos Luzzani por sus valiosos aportes en las reuniones de seguimiento del doctorado.

A las Dras. Susana Nowicki y Ana María Eiján y el Dr. Ezequiel Lacunza por haber accedido a ser jurados de esta tesis y dedicar su tiempo para la evaluación de la misma.

Al Dr. Javier Cotignola, por darme la posibilidad de desarrollar mi doctorado bajo su dirección, por la confianza y libertad para trabajar, y por la comprensión y ayuda, muy especialmente en este último tramo tan agitado de la tesis.

A la Dra. Elba Vázquez por ser un ejemplo de vocación científica y docente, por compartir su experiencia sumando aportes interesantes sobre mis temas de trabajo y por su calidez humana. A las Dras. Geraldine Gueron, Ayelén Toro y Sol Ruiz por estar siempre dispuestas a colaborar con lo que necesitara y por sus consejos y sugerencias sobre mis experimentos.

A mis geniales compañeros de laboratorio. A Sofi, Javi, Nico, Emi, Ale, Feli, Juan, Pablo, Mer y Daia, los más “viejitos” con los que compartí mis primeros años en el labo, por su ayuda y paciencia para enseñarme cuando recién empezaba, por el compañerismo, las bromas, las juntadas y la gran relación que aún perdura. A Gastón, Ro, Sabri, Agus, Pame, Dani, Ine, Nacho y Lau, por todo lo compartido en los últimos años, por su colaboración y por hacer el día a día más divertido con sus ocurrencias.

A los compañeros de QB y del ETI1, por los reactivos prestados, los protocolos compartidos, las charlas de pasillo y las anécdotas tragicómicas.

Al Dr. Javier De Las Rivas y todo su grupo por haberme recibido tan amablemente en su laboratorio y haberme hecho sentir muy cómoda e integrada. A Alberto, muchísimas gracias por la ayuda, la infinita paciencia y, por supuesto, los chistes y memes que siguen llegando para levantar el ánimo en los momentos que estoy “regulinchi”. A Elena, Natalia A. y Natalia S. por los almuerzos y charlas compartidas en el CIC y por seguir chismeando y haciéndonos el aguante a la distancia. A Jose y Enrique por las charlas futboleras y la “re” buena onda. Fue un gusto compartir esos meses con todo el equipo, me quedan muy lindos recuerdos del Labo 19 y de Salamanca.

A Sergio, fue muy lindo poder reencontrarnos después de tantos años. Muchas gracias por la ayuda en la previa del viaje y por las charlas con mates y alfajores de por medio. A Silvia, por los almuerzos compartidos y la buena onda. A ambos por las salidas por Salamanca y hacer de guías turísticos.

A mis amigas, por bancarme y alentarme tanto. A las de toda la vida, Nati y Anto, gracias por el aguante. A las que me permitió conocer Exactas, Juli, Lu V., Lu G., Vicky y Caro por poder contar con ustedes siempre, a pesar de las distancias y los desencuentros. Alla mia amiga genial Ju, por ser incondicional. Las adoro.

A los Fraccarolli-Jamardo y a los Romero-Amendolara, por acompañarme desde siempre.

A los Lanzillotta-Pinto, grazie mille. Pepe y la Nonna estarían contentos.

A mi familia, gracias infinitas. A mis abuelas y abuelos, que tan felices estarían, porque es en gran parte por su esfuerzo y sacrificio que hoy en día soy una privilegiada y puedo acceder a oportunidades que ellos no tuvieron. A Agus y Martín, por el aguante de siempre. A Mamá y Papá, por creer en mí y apoyarme sin condiciones en todo. Esto es tan mío como de ustedes. ¡Los quiero muchísimo!

A todas las personas que, quizás sin saberlo, con un consejo o simplemente con una palabra de aliento o un mate en el momento justo fueron fundamentales.

Índice

Abreviaturas	1
1. Introducción	3
1.1. La glándula prostática.....	4
1.2. Enfermedades asociadas a la próstata.	6
1.3. Cáncer de próstata.	6
1.4. Tejido óseo.....	10
1.5. Metástasis ósea del cáncer de próstata.	12
1.6. Vesículas extracelulares.....	16
1.7. Exosomas en cáncer.	20
2. Hipótesis y objetivos	24
2.1. Hipótesis.	25
2.2. Objetivo general.	25
2.3. Objetivos específicos.	25
3. Materiales y métodos.....	26
3.1. Cultivo celular.	27
3.1.1. Líneas celulares.	27
3.1.2. Condiciones de crecimiento.....	27
3.1.3. Preservación criogénica.	27
3.2. Estudio de comunicación intercelular en co-cultivo indirecto de células PC3 y MC3T3 o Raw264.7. .	27
3.3. Obtención y caracterización de vesículas símil exosomas (ELVs).....	28
3.3.1. Aislamiento de las ELVs.....	28
3.3.2. Citometría de flujo.	30
3.3.3. Western Blot.	31
3.3.3.1. Extracción de proteínas.	31
3.3.3.2. Determinación de la concentración de proteínas.	31
3.3.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), transferencia a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección de proteínas.	31
3.3.4. Microscopía electrónica de transmisión.....	32
3.3.5. Estudio del contenido de ARNs en las ELVs por <i>microarrays</i> de expresión.....	32
3.4. Evaluación del efecto del tratamiento con vesículas extracelulares aisladas de PC3 sobre MC3T3 y Raw264.7.	33
3.4.1. Exposición de células MC3T3 y Raw264.7 a ELVs de PC3.	33
3.4.2. Ensayo de viabilidad celular por MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2h-tetrazolio).	34
3.4.3. Estudio de morfología celular por microscopía confocal de fluorescencia.	34
3.5. Análisis del perfil transcripcional en las líneas celulares óseas.	35
3.5.1. Purificación de ARN total.	35

3.5.2. Tratamiento con DNAsa.....	35
3.5.3. <i>Microarrays</i> de expresión.....	35
3.6. Análisis bioinformáticos.....	35
3.6.1. Identificación de miRNAs abundantes en las ELVs derivadas de células PC3 a partir de datos de repositorios publicos.....	35
3.6.2. Estudio del contenido de ARNs en las ELVs derivadas de células PC3 y predicción de la la regulación que ejercerían en sus células receptoras.....	36
3.6.3. Expresión génica en células MC3T3 y Raw264.7 tratadas con ELVs de PC3.....	36
3.6.4. ARNs diferencialmente abundantes en vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de próstata y predicción de la red regulatoria que modularían en las células óseas.....	37
3.6.5. Predicción bioinformática de las funciones que podrían cumplir los miRNAs y lncRNAs transportados por las vesículas extracelulares de los tumores prostáticos en las células receptoras.....	37
3.6.6. Estudio de asociación entre sus niveles en el tejido tumoral prostático y la sobrevida libre de progresión (PFS) y modelado de un puntaje de riesgo de PFS.....	37
4. Resultados.....	40
4.1. Análisis de la comunicación célula tumoral prostática - célula precursora ósea.....	41
4.2. Aislamiento y caracterización de ELVs derivadas de células PC3.....	42
4.3. Estudio del efecto de la exposición a ELVs derivadas de PC3 en las células precursoras óseas MC3T3 y Raw264.7.....	43
4.3.1. Estudio de cambios en la viabilidad celular.....	44
4.3.2. Estudio de cambios morfológicos.....	44
4.3.3. Estudio de cambios de expresión génica.....	46
4.4. Análisis bioinformático del contenido de miRNAs de las ELVs derivadas de células PC3 y predicción de la función que estos ejercerían en sus células receptoras.....	49
4.5. Estudio del contenido de ARNs no codificantes de las ELVs de PC3 mediante microarrays de expresión y de la regulación que ejercerían en sus células receptoras.....	52
4.6. Identificación de ARNs diferencialmente abundantes en vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de próstata y predicción de la red regulatoria que modularían en las células óseas.....	54
4.7. Análisis de la relevancia clínica de los lncRNAs y mRNAs identificados: Estudio de la asociación entre sus niveles en el tumor prostático primario y la sobrevida libre de progresión.....	59
5. Discusión.....	70
Conclusión.....	76
Bibliografía.....	77

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
ADT	Terapia de privación de andrógenos
AGO2	Argonauta 2
ALIX	Proteína X de interacción con ALG2
ALP	Fosfatasa alcalina
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ATF4	Factor activador de la transcripción 4
AUC	Área bajo la curva
BMP	Proteína morfogenética del hueso
BSP	Sialoproteína de hueso
CAF	Fibroblasto asociado a cáncer
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
cirRNA	ARN circular
COL1A1	Colágeno de tipo I
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CXCR4	Receptor de quemoquinas C-X-C tipo 4
DHT	Dihidrotestosterona
DKK1	Dickkopf 1
DLX5	<i>Distal-Less Homeobox 5</i>
ELV	Vesícula símil exosoma
ESCRT	Complejo de clasificación endosómica requerido para el transporte
ET1	Endotelina 1
FasL	Ligando de Fas
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FN	Fibronectina
GLI2	Oncogén asociado a glioma 2
GM	Gangliósido
HIF1α	Factor inducible por hipoxia 1 α
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HSC	Célula madre hematopoyética
Hsp	Proteína de choque térmico
IC	Intervalo de confianza
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IGF	Factor de crecimiento símil insulina
IL	Interleuquina
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica
lncRNA	ARN no codificante largo
LPA	Ácido lisofosfatídico
M-CSF / CSF-1	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
miRNA	micro ARN
MMP	Metaloproteinasa de matriz
MRE	Elemento de respuesta a miRNAs

mRNA	ARN mensajero
MSC	Célula madre mesenquimal
MVB	Cuerpo multivesicular
NF-κB	Factor nuclear κ B
OCN	Osteocalcina
ON	Osteonectina
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
ORF	Marco abierto de lectura
OSX	Osterix
PC	Fosfatidilcolina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Fosfatidiletanolamina
PFS	Sobrevida libre de progresión
PI	Fosfatidilinositol
pre-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	miRNA primario
PS	Fosfatidilserina
PSA	Antígeno prostático específico
PTHrP	Proteína relacionada con la hormona paratiroidea
RANK	Receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RNAseq	Secuenciación del ARN
rRNA	ARN ribosomal
RUNX2	Factor de transcripción 2 de la familia RUNX
SNARE	Receptor de proteínas de fijación soluble de NSF
snoRNA	ARN nucleolar pequeño
snRNA	ARN nuclear pequeño
TF	Factor de transcripción
TfR	Receptor de transferrina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
tRNA	ARN de transferencia
TSG101	Proteína de susceptibilidad a tumores 101
uPA	Activador de plasminógeno urinario
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WNT	Proteína <i>Wingless-Int</i>

1. Introducción

1.1. La glándula prostática.

La próstata es una glándula accesoria del aparato genitourinario masculino situada delante del recto, por debajo de la vejiga y rodeando la parte proximal de la uretra (**figura 1**). Su función principal radica en secretar la mayor parte del plasma seminal, aportando sustancias capaces de proteger y nutrir a los espermatozoides. Entre ellas, se destaca el antígeno prostático específico (PSA) que se caracteriza por ser una serin-proteasa de expresión andrógeno-dependiente que cliva las seminogelinas del coágulo seminal, favoreciendo la libre motilidad de los espermatozoides¹.

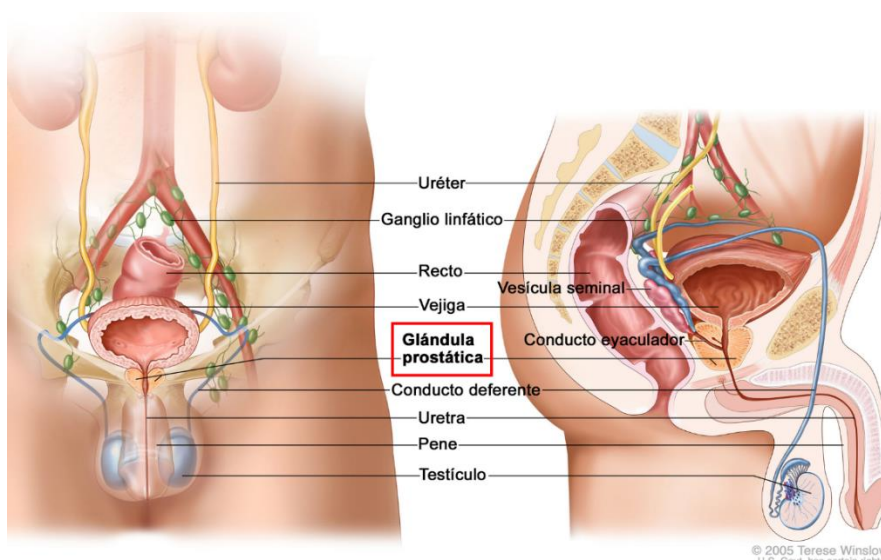


Figura 1: Localización de la próstata.

La figura muestra la localización anatómica de la próstata. Adaptación².

La glándula prostática está dividida en cinco zonas anatómicas (**figura 2**). La zona central constituye el 20-25% del tejido glandular de la próstata, expandiéndose en forma de cono alrededor de los conductos eyaculatorios y proyectándose hasta la base de la vejiga. La zona de transición, junto con la región periuretral, representa el 5-10% del tejido glandular prostático, mientras que la zona periférica, comprendida por las partes apical, posterior y lateral de la glándula, constituye aproximadamente el 70% restante. La zona fibromuscular, por el contrario, comprende tejido no glandular y separa la zona de transición del resto de los compartimentos glandulares de la próstata³.

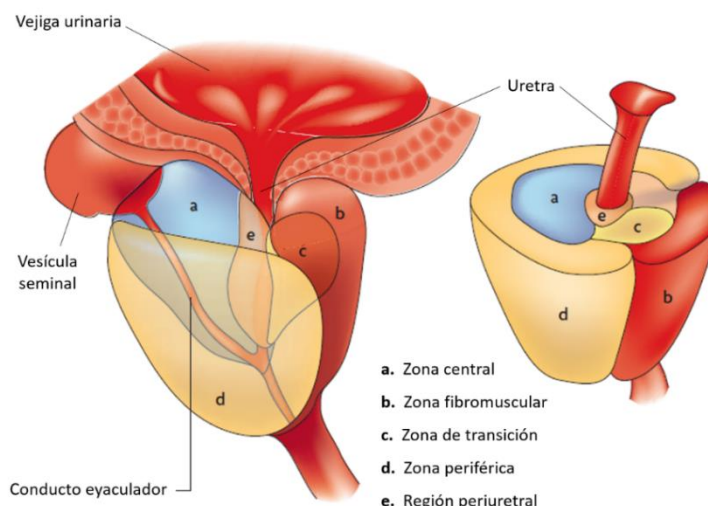


Figura 2: Zonas anatómicas de la próstata.

En la figura se muestran las diferentes zonas anatómicas de la próstata. Adaptación⁴.

Histológicamente, la próstata consta de un epitelio glandular que se halla inserto en un estroma fibromuscular (**figura 3**). Este epitelio está compuesto por una capa secretoria luminal de células cilíndricas sensibles a andrógenos, responsables de la producción y secreción de PSA, fosfatasa ácida prostática y calicreína humana 2 al fluido seminal y, por debajo de ella, una capa células epiteliales basales cuboides y células neuroendócrinas. Una membrana basal compuesta por matriz extracelular separa las células basales del estroma³.

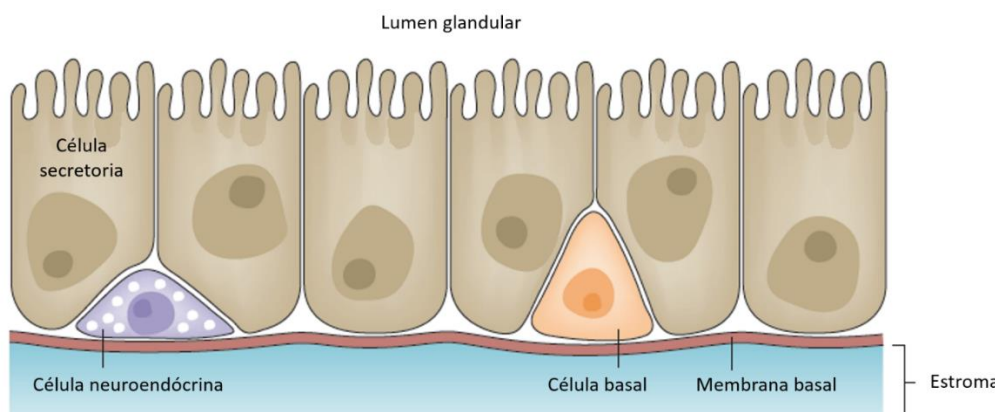


Figura 3: Histología de la próstata.

En la figura se muestra un esquema del epitelio glandular de la próstata, en donde se pueden observar las células secretorias, basales y neuroendócrinas. Adaptación³.

El desarrollo normal y el mantenimiento de la próstata están principalmente regulados por los andrógenos. La hipófisis, por medio de la hormona luteinizante, estimula a las células de Leydig de los testículos a producir testosterona. En la próstata, esta hormona esteroidea es convertida por la 5 α -reductasa a dihidrotestosterona (DHT), un metabolito más activo. Luego, la DHT se une al receptor de andrógenos (AR), un factor de transcripción citosólico perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares activados por ligandos. La unión ligando-receptor (DHT-AR) produce la disociación del AR de chaperonas, lo que permite la dimerización

y translocación del AR al núcleo en donde se une a secuencias consenso en el ADN (elementos de respuesta a andrógenos o ARE) para regular la transcripción de genes como, por ejemplo, *KLK3* que codifica para el PSA^{1,5}.

1.2. Enfermedades asociadas a la próstata.

Dentro de las patologías prostáticas pueden diferenciarse dos tipos: las no proliferativas y las proliferativas. En el primer grupo se encuentran las prostatitis, procesos de naturaleza inflamatoria o infecciosa que ocurren en la próstata y constituyen la causa más común de infecciones de las vías urinarias en los hombres. Generalmente, se dan en las zonas de transición y periférica⁶. Entre las patologías prostáticas proliferativas se encuentran la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata, siendo esta última la única de carácter maligno entre las mencionadas. La hiperplasia prostática benigna tiene lugar, frecuentemente, en la zona de transición de la próstata y se caracteriza por presentar una proliferación desregulada que provoca un aumento del tamaño de la glándula, ocasionando grados variables de obstrucción en la evacuación de la vejiga⁶. El cáncer de próstata es una enfermedad neoplásica que se origina con mayor frecuencia en la zona periférica de la glándula.

1.3. Cáncer de próstata.

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia maligna más diagnosticada y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial (**figura 4A-B**); mientras que en Argentina es el tipo de cáncer de mayor incidencia en la población masculina y la tercera causa de muerte por cáncer (**figura 4C-D**)⁷.

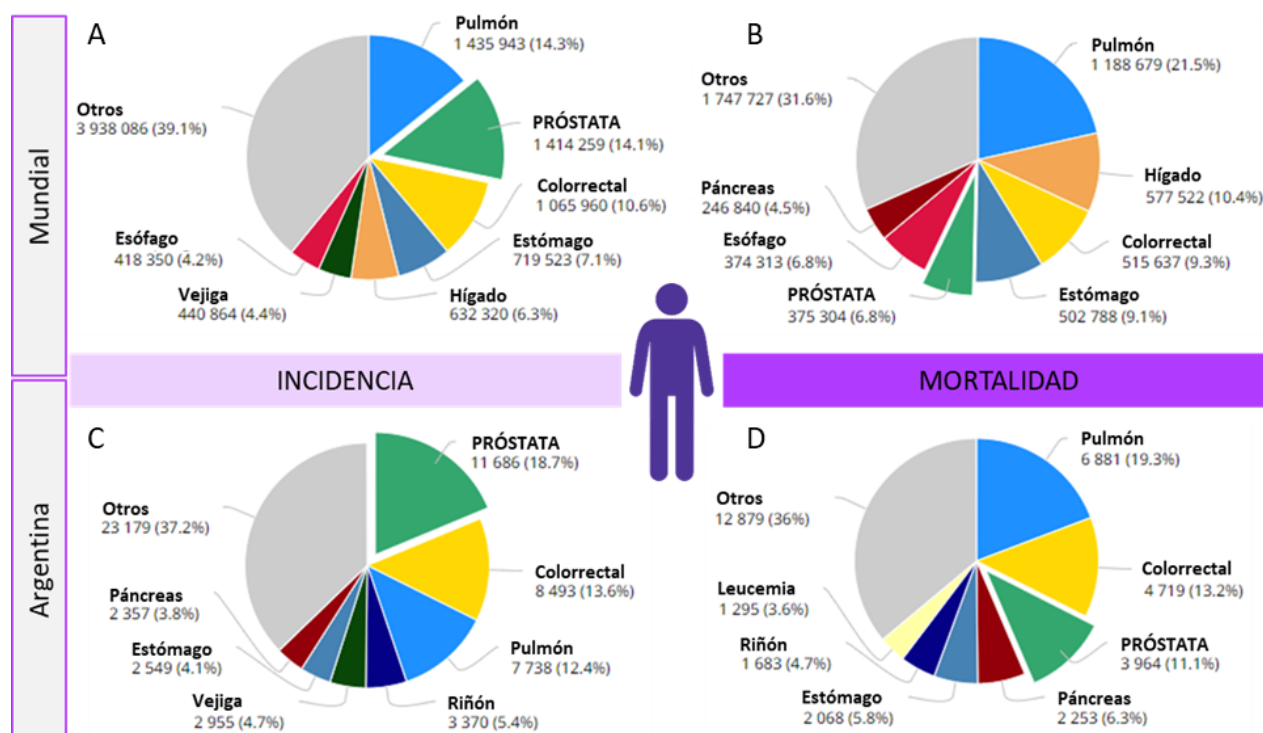


Figura 4: Estadísticas de cáncer en hombres para el año 2020.

Número estimado de casos diagnosticados y muertes a nivel mundial (A-B) y en Argentina (C-D). Adaptación⁷.

Al igual que en otros tipos de cáncer, los tumores prostáticos pueden progresar y adquirir la capacidad de invadir, colonizar y dañar otros tejidos u órganos. En la **figura 5** se muestran los sellos o características distintivas del cáncer en la actualidad⁸.



Figura 5: Sellos distintivos del cáncer que posibilitan el desarrollo y la progresión tumoral. Adaptación⁸.

La patogénesis del cáncer de próstata refleja tanto componentes hereditarios como ambientales⁴. Los factores hereditarios son responsables de un porcentaje relativamente pequeño de los casos (alrededor del 10%) y, generalmente, están asociados con la enfermedad de inicio temprano⁹. Los desbalances hormonales y la exposición a factores ambientales tales como agentes infecciosos y carcinógenos dietarios producen daño en la próstata, desarrollándose una inflamación crónica con lesiones regenerativas de riesgo, condición denominada atrofia proliferativa inflamatoria. Estudios histopatológicos, epidemiológicos y genéticos evidenciaron la importancia que tendría la inflamación crónica en la carcinogénesis prostática⁴. Asimismo, los tumores prostáticos pueden desarrollarse por una acumulación de cambios genéticos somáticos y/o epigenéticos, resultando en la inactivación de genes supresores tumorales y la activación de oncogenes. Entre las alteraciones génicas más frecuentes se encuentran la fusión *TMPRSS2::ERG*, mutaciones en *PTEN* y *TP53*, y amplificaciones en el proto-oncogen *C-MYC* y en *AR*¹⁰.

Si bien los factores predisponentes son múltiples, se considera que la edad es el principal factor de riesgo. Pueden encontrarse lesiones premalignas conocidas como neoplasias intraepiteliales prostáticas (**figura 6**) en hombres jóvenes (~20 años de edad), las cuales son bastante comunes en hombres de alrededor de 50 años. En estas lesiones se suelen observar células luminales anormales con núcleos agrandados, pero se mantiene intacta la membrana basal, por lo cual no hay una invasión del estroma. Se reconocen estadios de neoplasias intraepiteliales prostáticas de bajo y alto grado, siendo este último un indicador de riesgo para el desarrollo

de tumores prostáticos¹¹. Dado que las neoplasias intraepiteliales prostáticas no producen un aumento de los niveles de PSA, sólo puede ser detectada por análisis histológico.

El cáncer de próstata clínicamente detectable, en general, no se manifiesta hasta los 60 o 70 años de edad⁹. Alrededor del 95% los tumores prostáticos son adenocarcinomas, es decir que se desarrollan en el epitelio luminal de la glándula, con ruptura de la membrana basal e invasión del estroma¹² (**figura 6**). Mientras se encuentra localizado, el cáncer de próstata es mayoritariamente curable por intervención quirúrgica y/o radioterapia; sin embargo, si no es detectado a tiempo, puede expandirse por fuera de la glándula provocando una invasión local de las vesículas seminales y, posteriormente, el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos, hígado, pulmones y, principalmente, en hueso¹³. Esta progresión hacia una etapa metastásica de la enfermedad suele estar acompañada por un cambio desde un estado de crecimiento y proliferación dependiente de los andrógenos a otro independiente de los andrógenos; este último conocido como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC, del inglés *Castration-Resistant Prostate Cancer*)^{5,9}.

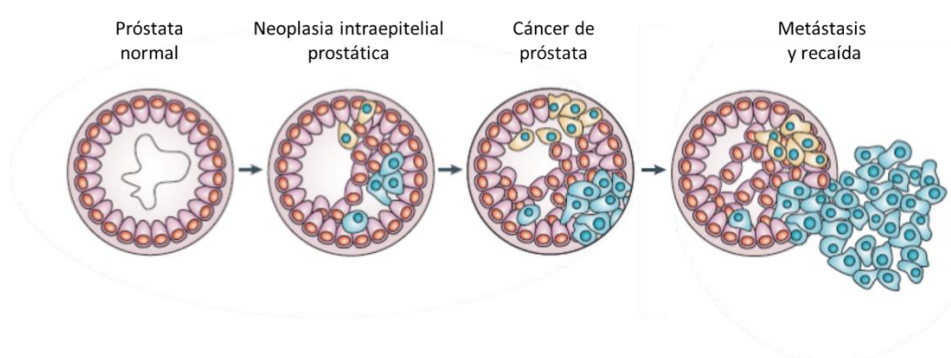


Figura 6: Progresión del cáncer de próstata.

En la figura se muestran las diferentes etapas de la progresión de los tumores prostáticos. Adaptación¹⁴.

La sospecha de una patología prostática, incluidos los tumores prostáticos, se da por la elevación del PSA sérico y ciertas afecciones clínicas como problemas para orinar por compresión de la uretra. El incremento del PSA sérico suele correlacionarse con un crecimiento anormal de la glándula prostática, motivo por el cual es un biomarcador ampliamente utilizado para el diagnóstico del cáncer de próstata². Sin embargo, este estudio aislado tiene poca especificidad, ya que los niveles de PSA también se encuentran aumentados en otras patologías prostáticas e incluso aumentan levemente con la edad. Por este motivo, un ajuste por edad o volumen prostático puede ser de utilidad para evitar realizar biopsias innecesarias, así como las complicaciones y molestias que estas intervenciones pueden traer aparejadas¹⁵. La cuantificación en orina del PCA3 (*prostate cancer antigen 3*), un ARN no codificante largo (lncRNA), es un estudio complementario al PSA sérico y que muestra una sensibilidad y especificidad similares a este biomarcador, por lo que no suele realizarse de forma rutinaria. Se han propuesto también herramientas más novedosas que pueden emplearse como pruebas de segunda línea; éstas incluyen el Índice de Salud Prostática (PHI, por *Prostate Health Index*) y la prueba 4Kscore, que se realizan a partir de muestras de sangre y consisten en el cálculo de un puntaje que contempla los niveles de PSA junto con los datos clínicos del paciente^{15,16}. Los exámenes complementarios que permiten el diagnóstico diferencial y confirmatorio de cáncer de próstata comprenden el examen digito-rectal, la ultrasonografía transrectal, la resonancia magnética transrectal y la biopsia prostática².

En el caso que un paciente presente niveles elevados de PSA sérico (> 4 ng/ml) y los estudios complementarios indican una alta probabilidad de un tumor prostático, se suele realizar una biopsia. Si esta biopsia confirma la presencia de un tumor, el mismo se clasifica histológicamente usando la puntuación de Gleason¹⁷. Este sistema asigna patrones histológicos (grados de Gleason) que van desde un grado 1 en donde el tejido prostático es histológicamente normal hasta un grado 5 en donde se ha perdido por completo la histoarquitectura de la glándula y se observan células neoplásicas que infiltran el estroma (**figura 7**). Debido a que los tumores prostáticos son altamente heterogéneos, se determina la puntuación de Gleason, que se obtiene al sumar de los dos grados de Gleason predominantes, y recibe valores que varían entre 2 (glándula histológicamente normal, no tumoral) y 10 (adenocarcinoma prostático pobremente diferenciado o de alto grado). Por ejemplo, un puntaje de Gleason de 7 puede estar formado por los grados de Gleason 3+4 (predomina el 3 sobre el 4) ó 4+3 (predomina el 4 sobre el 3)¹⁸. Los puntajes de Gleason ≤ 4 no se consideran como tejidos tumorales.

En 2014, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) propuso la implementación de un sistema de clasificación de grupos pronóstico basado en la puntuación de Gleason original. Así se definieron 5 grupos: ISUP 1 (puntaje de Gleason ≤ 6) con riesgo bajo de progresión de la enfermedad; ISUP 2 e ISUP 3 (puntajes de Gleason 7(3 + 4) y 7(4 + 3); respectivamente) con riesgo intermedio de progresión; ISUP 4 (puntaje de Gleason 8) e ISUP 5 (puntajes de Gleason 9 y 10) con riesgo alto de progresión¹⁹. Este sistema tiene el beneficio potencial de contribuir a una disminución del sobre-tratamiento del cáncer de próstata de bajo grado (ISUP 1) y, por ende, de los efectos secundarios generados por el mismo¹⁹. Además, permite definir la naturaleza indolente del cáncer y establecer una estrategia inicial de vigilancia activa en pacientes de bajo grado²⁰. Sin embargo, para los pacientes con riesgo de progresión de la enfermedad intermedio (ISUP 2-3) el curso clínico aún es mayoritariamente impredecible²¹, por lo que el gran desafío en este sentido es encontrar nuevos biomarcadores capaces de estratificar el riesgo.

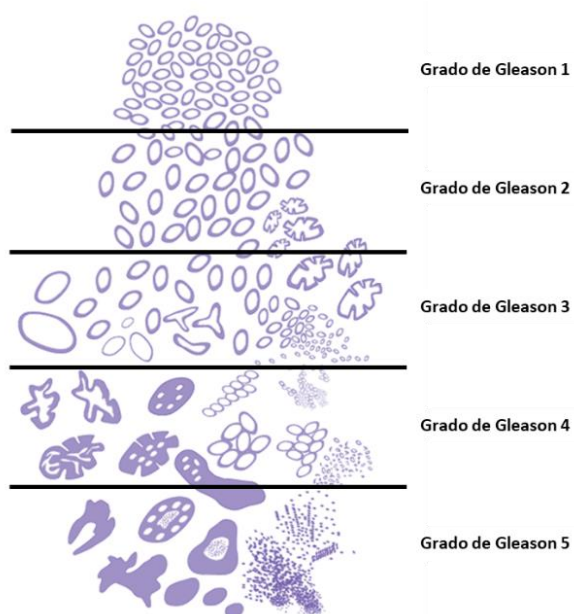


Figura 7: Esquema de los cambios histológicos de las células prostáticas durante la progresión tumoral.

La figura representa las características de los patrones histológicos de la próstata correspondientes a cada grado de Gleason. Adaptación¹⁹.

Una vez diagnosticado el cáncer de próstata, mediante métodos de estadificación, los oncólogos determinan cuán avanzada se encuentra la enfermedad. El sistema de estadificación de uso más generalizado es el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)^{22,23}. Este se basa en la extensión del tumor primario (categoría T), la propagación a los ganglios linfáticos cercanos (categoría N) y la presencia de metástasis en

órganos distantes (categoría M). Existen dos tipos de estadíos T, el clínico que se determina en base al examen físico, la biopsia prostática y los estudios por imágenes, y el patológico que suele ser más preciso ya que también incorpora la información obtenida de la observación del tejido prostático luego de la cirugía.

Conociendo las características del tumor y las particularidades individuales del paciente, se elige el tratamiento a implementar, siendo los más comunes la prostatectomía radical, la radioterapia, la terapia hormonal (ADT por *androgen deprivation therapy*), la quimioterapia y la vigilancia activa². Para los pacientes con cáncer resistente a la castración, ningún tratamiento es curativo y los cambios consecutivos en la terapia aplicada suelen favorecer el desarrollo de resistencia a drogas.

1.4. Tejido óseo.

El hueso es una forma especializada de tejido conectivo mineralizado, cuyas funciones más importantes incluyen la locomoción, soporte y protección de tejidos blandos, homeostasis mineral y nicho de la médula ósea²⁴⁻²⁶. Se clasifica en esponjoso o trabecular, que está más estrechamente asociado con las capacidades metabólicas, y cortical o compacto, que suele proporcionar una mayor resistencia mecánica²⁴. La matriz extracelular, que representa aproximadamente el 90% del hueso, está constituida por sales inorgánicas (principalmente, de calcio y fósforo en forma de cristales de hidroxapatita)^{24,27,28} y un componente orgánico compuesto por colágeno (predominantemente de tipo I; aunque los de tipo V, VI, VIII y XII también se encuentran), osteocalcina (OCN), osteonectina (ON), osteopontina (OPN), fibronectina (FN), sialoproteínas de hueso II (BSP), proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), factores de crecimiento y proteoglicanos pequeños ricos en leucina^{24,29,30}.

Los principales tipos celulares que constituyen el tejido óseo son los osteoblastos, las células de revestimiento, los osteocitos y los osteoclastos²⁴. Los osteoblastos son los responsables de la osteogénesis ya que sintetizan y secretan proteínas para formar el hueso nuevo u osteoide, el cual luego es mineralizado y se convierte en hueso maduro³¹. Los osteoblastos se originan a partir de células madre mesenquimales que también tienen la capacidad de diferenciarse a adipocitos o condrocitos²⁸. Por lo tanto, su compromiso hacia un linaje de progenitores óseos requiere la expresión de genes específicos, seguidos de pasos temporalmente programados que incluyen la síntesis de BMPs y miembros de la vía de WNT (*Wingless-Int*)³². Las BMPs tienen un rol importante en la diferenciación de los osteoblastos ya que estimulan su crecimiento y diferenciación, al igual que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β)³³. Asimismo, la expresión del factor de transcripción 2 de la familia RUNX (RUNX2), el activador transcripcional osterix (OSX/SP7) y el factor de transcripción *Distal-Less Homeobox 5* (DLX5) resulta crucial para la diferenciación de los osteoblastos^{34,35}. *RUNX2* es un gen maestro para este proceso, siendo capaz de regular positivamente la expresión de otros genes osteoblásticos como colágeno tipo I (*COL1A1*), fosfatasa alcalina (*ALP*, uno de los primeros marcadores de diferenciación que expresan los osteoblastos inmaduros), *BSP* y *OCN*³⁵⁻³⁷. Los osteoblastos maduros forman una capa simple de células cuboides con alto contenido de retículo endoplasmático rugoso y grandes complejos de Golgi, pudiendo permanecer como tales en forma activa, sufrir apoptosis, ser rodeados por matriz y convertirse en osteocitos, o dar origen a las células de revestimiento^{24,38}.

Los osteoclastos son células multinucleadas que se originan a partir de células mononucleares del linaje de las células madre hematopoyéticas bajo la influencia de varios factores, entre los que se encuentran el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF-1) secretado por células mesenquimales progenitoras óseas y osteoblastos, y el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) secretado por

osteoblastos, osteocitos y células estromales³⁹⁻⁴². Los osteoclastos se localizan en el endostio y en el periostio (membranas de tejido conectivo que revisten las superficies óseas interna y externa, respectivamente) y pueden presentar dos morfologías distintas: cuando migran desde la médula ósea hacia el sitio de resorción tienen una forma aplanada y no polarizada. En cambio, durante la remodelación ósea se polarizan exhibiendo cuatro tipos de dominio de membrana: la zona de sellado y el borde rugoso o en forma de “cepillo”, que están en contacto con la matriz ósea, y los dominios basolateral y secretor⁴³. Al inicio de la degradación ósea, los osteoclastos liberan ácido clorhídrico y proteasas desde el dominio en “cepillo” que disuelven los cristales de hidroxiapatita y degradan la matriz orgánica formando una laguna de resorción. Los productos de la degradación son endocitados, transportados a través de la célula y exocitados en el dominio secretor, permitiéndoles así degradar grandes cantidades de hueso sin alejarse de la superficie de resorción⁴⁴. Los factores necesarios y suficientes para que ocurra la osteoclastogénesis son M-CSF, que se une a su receptor cFMS en los precursores de osteoclastos, estimulando su proliferación e inhibiendo su apoptosis⁴⁵, y RANKL que se une a su receptor (RANK) en los precursores de osteoclastos favoreciendo su diferenciación y actividad⁴⁶. Estas células comienzan entonces a expresar la fosfatasa ácida resistente al tartrato, un marcador de diferenciación de los osteoclastos. Luego, se fusionan y comienzan a expresar otros marcadores de diferenciación como el receptor de calcitonina y la catepsina K^{47,48}. A su vez, los osteoblastos, las células estromales y los fibroblastos, entre otros tipos celulares, secretan el receptor *decoy* de RANKL, osteoprotegerina (OPG)⁴⁹⁻⁵¹. OPG compite con RANK por la unión a RANKL, disminuye los niveles de RANKL disponibles para la activación de los osteoclastos y, consecuentemente, tiene la capacidad de inhibir la osteoclastogénesis⁴⁹. Por lo que el balance entre los niveles de RANKL y OPG es el cual determina el efecto neto sobre los osteoclastos⁴⁶. Así, el sistema RANKL/RANK/OPG es el principal mediador de este proceso⁵¹.

El hueso es un tejido dinámico que experimenta un proceso continuo de remodelación para mantener la resistencia y la integridad del esqueleto, siendo sustituido anualmente un 10% del mismo⁵². En un mecanismo finamente equilibrado, acoplado y secuencial, los osteoclastos degradan hueso liberando factores de crecimiento y calcio, mientras que los osteoblastos lo reemplazan por tejido óseo nuevo mediante un proceso que depende del compromiso, la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos junto con la producción de colágeno de tipo I y posterior mineralización para formar la matriz calcificada del hueso (**figura 8**)⁵². Por su parte, los osteocitos también participan en el proceso de remodelación al percibir la tensión mecánica y enviar señales a los osteoclastos y osteoblastos⁵³, y las células de revestimiento al formar tanto un recubrimiento sobre los sitios de remodelación y las superficies óseas, como conductos para comunicarse con los osteocitos⁵⁴. El endostio y el periostio contienen una población de macrófagos tisulares, los osteomacrófagos, que cumplen un rol crítico en la formación ósea y la mineralización, formando parte del recubrimiento celular sobre los lugares de remodelación y coordinando el acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos al expresar y secretar citoquinas osteoactivas, metaloproteasas de matriz (MMPs) y BMPs^{55,56}.

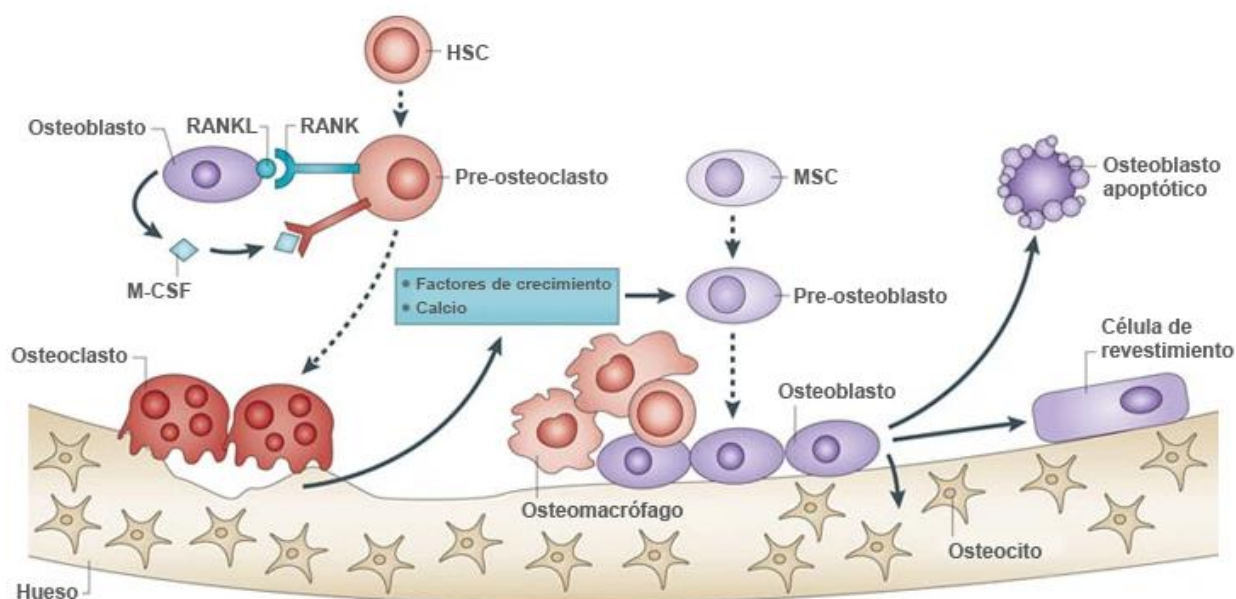


Figura 8: Remodelación ósea.

En la figura se esquematizan las células y señales involucradas en la remodelación fisiológica del tejido óseo. HSC: célula madre hematopoyética, MSC: célula madre mesenquimal, RANK: receptor activador de NF- κ B, RANKL: ligando de RANK, M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos. Adaptación⁵².

1.5. Metástasis ósea del cáncer de próstata.

Los tumores primarios tienen la capacidad de condicionar la médula ósea mediante la producción de diversos factores circulantes, como OPN y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), que se dirigen a las células del microambiente óseo y lo preparan para la localización y colonización tumoral, constituyendo así un microambiente pre-metastásico⁵². Luego, la célula tumoral debe sufrir una serie de cambios fenotípicos que le permitirán abandonar el órgano de origen y colonizar un órgano distante; a esta sucesión de múltiples pasos se la conoce como cascada metastásica (**figura 9**). En primer lugar, las células tumorales se desprenden del tumor primario degradando las membranas basales subyacentes, invaden los tejidos circundantes e ingresan a la microvasculatura de los sistemas circulatorio y linfático (intravasación)⁵⁷. Una vez en el torrente sanguíneo, estas células tumorales circulantes (CTCs) deben sobrevivir a distintos tipos de estrés y evadir al sistema inmune, lo cual es facilitado por las plaquetas que se unen a la superficie de las mismas actuando como escudos e incrementando su potencial metastásico⁵⁸. Atraídas por distintos factores, como RANKL y la quemoquina CXCL12, las CTCs prostáticas se adhieren al endotelio en respuesta a TGF- β y al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo atraviesan (extravasación) e ingresan a la cavidad de la médula ósea⁵⁹, localizándose preferentemente en el nicho osteoblástico⁶⁰. Los osteoblastos y las células estromales del microambiente óseo atraen y regulan a las células tumorales, favoreciendo su anclaje a través de interacciones proteicas que incluyen integrinas (como la de $\alpha 4 \beta 1$ con la molécula de adhesión VCAM-1), quemoquinas (como CXCL12 con el receptor CXCR4), BMPs, receptores Notch, nestina y OPN; a la vez que la degradación ósea por parte de los osteoclastos también puede favorecer su migración⁵². Estos mecanismos son similares a los empleados en el reclutamiento fisiológico de las células madre hematopoyéticas al hueso; en consecuencia, las células tumorales metastásicas compiten con estas células para ocupar la médula ósea. Las células tumorales que finalmente sobreviven y se adaptan al nuevo microambiente, pueden permanecer en un estado de latencia o comenzar un proceso de reclutamiento de distintos tipos celulares

(osteoclastos, osteoblastos, fibroblastos, células madre hematopoyéticas y mesenquimales, linfocitos, macrófagos, plaquetas, neuronas, osteocitos) que generan modificaciones de la matriz ósea, favorecen la invasión y, posteriormente, la expansión tumoral en el hueso^{52,60}.

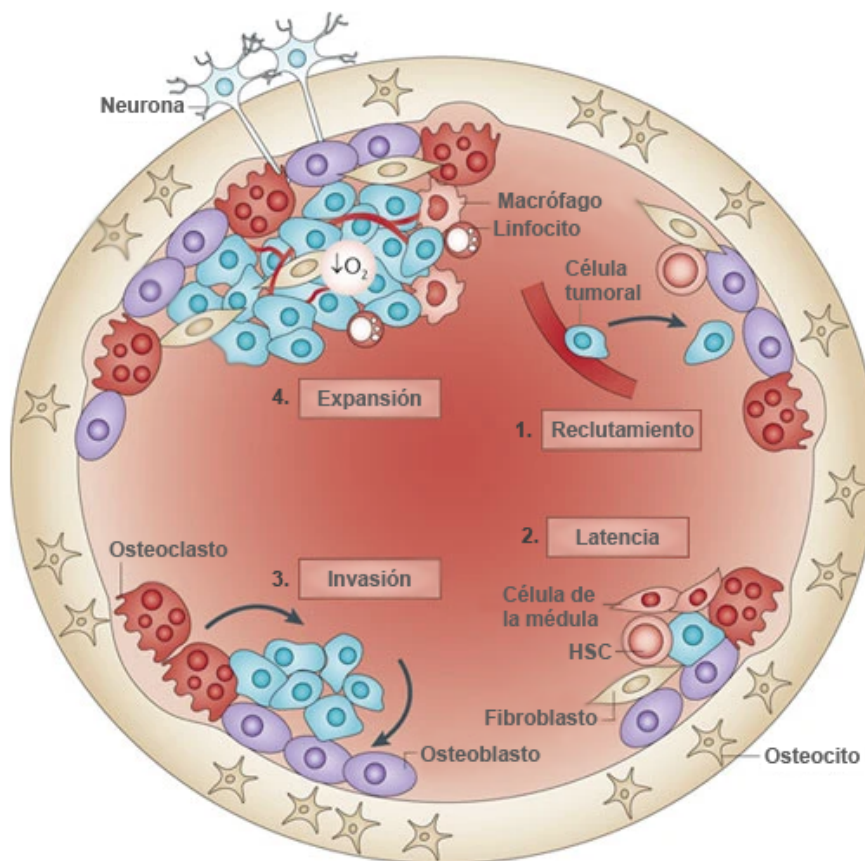


Figura 9: Etapas de las metástasis óseas.

Esquemización de los distintos pasos que comprende la cascada metastásica luego de la llegada de la célula tumoral prostática al hueso. HSC: célula madre hematopoyética. Adaptación⁵².

Los tumores que desarrollan metástasis en el hueso se caracterizan por ser mayoritariamente incurables y por tener consecuencias devastadoras sobre la salud de los pacientes, que suelen presentar dolor intenso, fracturas patológicas, hipercalcemia y síndromes por compresión de la médula espinal u otros nervios^{22,52}. Particularmente, las células tumorales prostáticas tienen una gran afinidad por el microambiente óseo, dando origen allí a tumores secundarios clínicamente relevantes que constituyen una de las principales causas de pérdida de calidad de vida y reducción de la sobrevida en los pacientes con cáncer de próstata⁵⁹. El hueso es el principal sitio de metástasis del cáncer de próstata (85 - 90% de los casos) y se estima que alrededor del 80% de los hombres con un estadio avanzado de la enfermedad desarrollará metástasis óseas⁶¹⁻⁶³.

Las células tumorales que se establecen en el tejido óseo pueden inducir lesiones osteoblásticas, con una formación excesiva de hueso, u osteoclásticas, con una resorción ósea desmedida. Sin embargo, es frecuente la co-existencia de ambos tipos de lesiones dando lugar a metástasis mixtas que presentan igualmente un desbalance en el proceso fisiológico de remodelación ósea⁶⁴. En el caso del cáncer de próstata, las metástasis

por parte de las células tumorales, que también liberan otros factores osteolíticos como IL-11, IL-6, VEGF, factor de necrosis tumoral (TNF) y Jagged1, induciendo una mayor resorción ósea y, en consecuencia, un incremento en la liberación de calcio⁵². A la vez, la hipoxia asociada al tumor y el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) en conjunto con TGF- β , aumentan la producción de VEGF y CXCR4 que favorecen la angiogénesis y el reclutamiento de células tumorales que pueden adquirir características similares a las de las células óseas (osteomimetismo). El ácido lisofosfatídico (LPA) y la adenosina difosfato (ADP) derivados de las plaquetas actúan sobre las células tumorales induciendo su crecimiento y la liberación de IL-8 e IL-6.

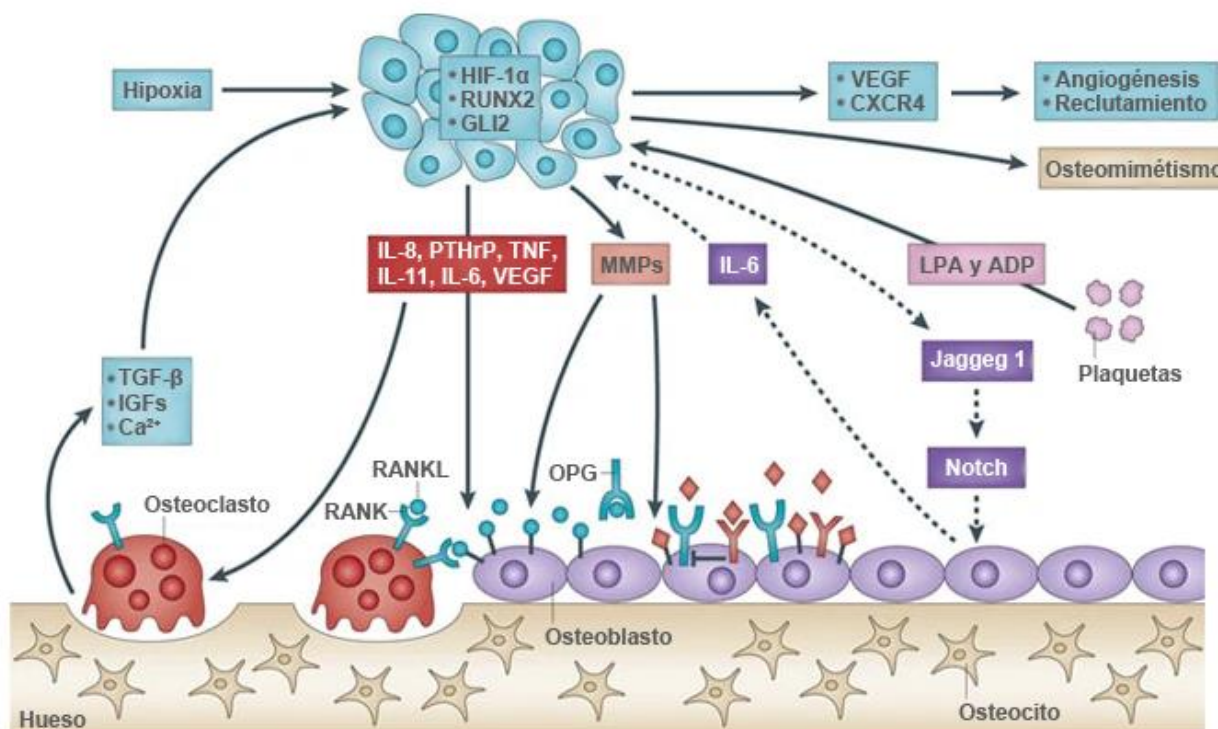


Figura 11: Osteólisis asociada a tumores.

En la figura se esquematizan los procesos moleculares que llevan a una degradación ósea inducida por las células tumorales. HIF1 α : factor inducible por hipoxia 1 α ; RUNX2: factor de transcripción 2 de la familia RUNX; GLI2: oncogén asociado a glioma 2; ADP: adenosina difosfato; IL: interleuquina; CXCR4: receptor de quemoquinas C-X-C tipo 4; TNF: factor de necrosis tumoral; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; MMP: metaloproteinasa de membrana; PTHrP: proteína relacionada con la hormona paratiroidea; LPA: ácido lisofosfatídico; OPG: osteoprotegerina; RANK: receptor activador de NF- κ B, RANKL: ligando de RANK; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; IGF: factor de crecimiento similar insulina. Adaptación⁵².

Estas interacciones entre los distintos tipos celulares constituyen lo que se conoce como *ciclo vicioso de las metástasis óseas* (figura 12). Los diversos factores que secretan las células tumorales, entre ellos las metaloproteinasas de matriz (MMPs), generan un aumento en la proporción de RANKL liberado por los osteoblastos, en relación con la cantidad de OPG en el microambiente. RANKL se une a RANK en la superficie de los osteoclastos promoviendo la resorción ósea y, por ende, la estimulación de las células tumorales que responden a los factores liberados⁶⁸.

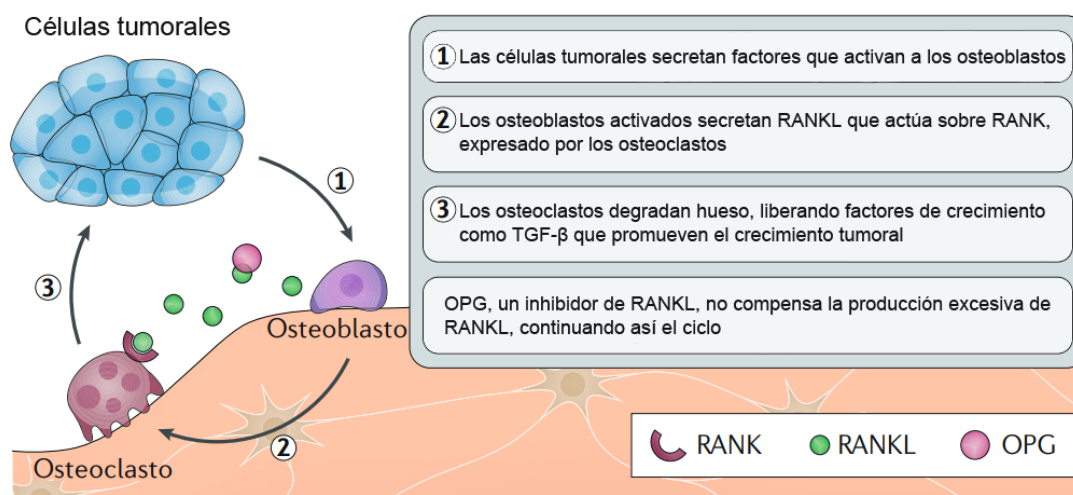


Figura 12: Ciclo vicioso de las metástasis óseas.

El esquema muestra el ciclo de retroalimentación positiva entre las células tumorales, los osteoblastos y los osteoclastos; el cual termina en la estimulación del crecimiento tumoral. OPG: osteoprotegerina; RANK: receptor activador de NF-κB, RANKL: ligando de RANK; TGF-β: factor de crecimiento transformante β. Adaptación⁶⁹.

1.6. Vesículas extracelulares.

Las vesículas extracelulares conforman un conjunto heterogéneo de estructuras delimitadas por bicapas lipídicas que inicialmente fueron descritas como un medio para la eliminación de compuestos innecesarios de la célula⁷⁰. Sin embargo, en la actualidad se sabe que poseen una gran variedad de funciones al participar en la comunicación intercelular, actuando como vehículos de señalización tanto en procesos homeostáticos como patológicos⁷¹.

Se demostró que prácticamente todas las células son capaces de secretar varios tipos de vesículas extracelulares que, en cierta medida, reflejan el estado en tiempo real de las células de origen al tener un contenido de biomoléculas que varía dependiendo del contexto celular. Estas vesículas se encuentran en la mayoría de los fluidos corporales como la sangre, la orina, la saliva y la leche materna; lo cual las convierte en buenas candidatas para ser utilizadas como biopsias líquidas. Además, por su origen celular, son altamente biocompatibles y poco inmunogénicas, por lo que tienen potencial como vehículos de administración de fármacos y reactivos terapéuticos⁷².

Las vesículas extracelulares pueden dividirse en dos grupos principales: los exosomas y las microvesículas. Las microvesículas tienen ~100 a 1000 nm de diámetro y se originan por evaginaciones de la membrana plasmática, conteniendo proteínas de la superficie celular y componentes citoplasmáticos. Los exosomas, que tienen ~30 a 100 nm de diámetro, se generan por medio de la vía endocítica con participación de una maquinaria que estaría involucrada en la selección de su contenido, como son los complejos de clasificación endosómica requeridos para el transporte (ESCRT) y los dominios ricos en tetraspaninas^{73,74}. En primer lugar, se produce una invaginación de la membrana plasmática que genera endosomas tempranos con proteínas de la superficie celular y componentes extracelulares (**figura 13**). En el proceso de maduración de estos endosomas, se van formando los endosomas tardíos con participación de la red trans-Golgi y el retículo endoplasmático que definen su composición. Luego, se forman los cuerpos multivesiculares intracelulares que

contienen vesículas intraluminales. Finalmente, estos cuerpos multivesiculares pueden fusionarse con los lisosomas para ser degradados o con la membrana celular para liberar exosomas al espacio extracelular⁷⁵.

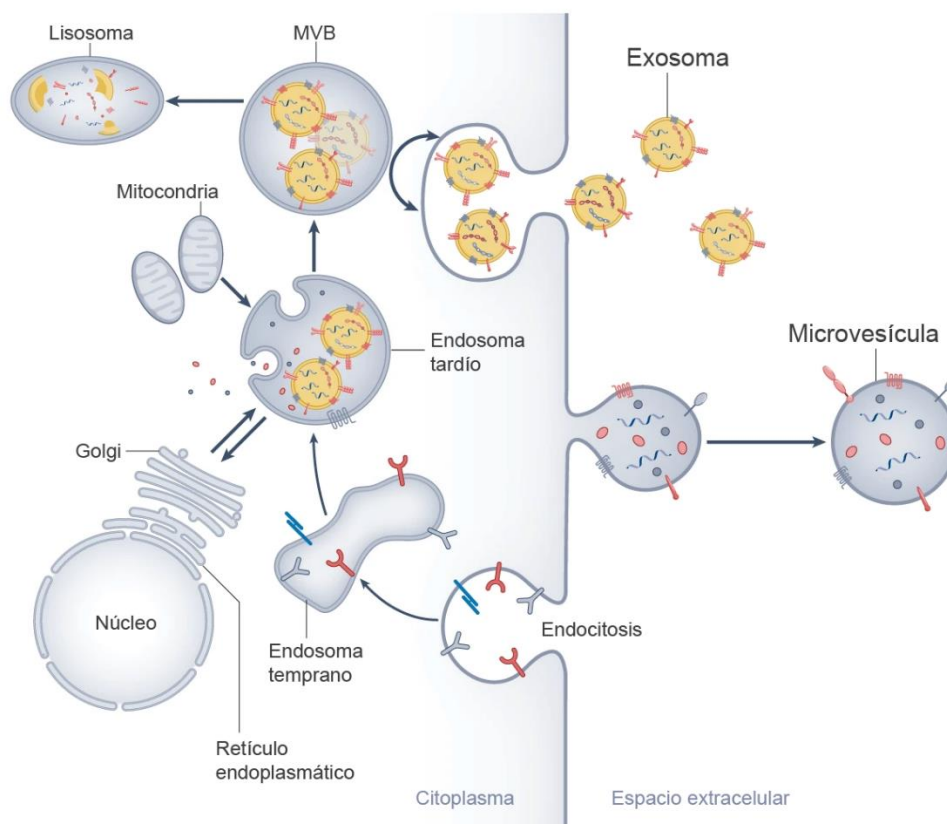


Figura 13: Biogénesis de las vesículas extracelulares.

La figura esquematiza la biogénesis de los dos tipos principales de vesículas extracelulares: los exosomas y las microvesículas. MVB: Cuerpos multivesiculares. Adaptación⁷⁵.

Luego de su liberación, las vesículas extracelulares pueden ser internalizadas por sus células receptoras mediante endocitosis o descargar su contenido por fusión con la membrana plasmática (**figura 14**). La especificidad de la célula blanco puede estar determinada por interacciones específicas entre proteínas enriquecidas en la superficie de las vesículas extracelulares y los receptores de la membrana plasmática de las células receptoras. La célula receptora puede ser del mismo tipo celular del que se originó la vesícula, generando respuestas de tipo autócrinas, o de otro tipo celular, generando una respuesta parácrina⁷⁶. Entre los mediadores que facilitan estas interacciones se encuentran las integrinas, los lípidos, las lectinas, las tetraspaninas, los proteoglicanos y distintos componentes de la matriz extracelular⁷¹. Las bases celulares y moleculares del direccionamiento específico hacia determinadas células receptoras aún no están completamente descritas; sin embargo, se reportó que varias integrinas de los exosomas pueden interactuar con moléculas de adhesión en la superficie de las células aceptoras como las moléculas de adhesión intercelulares (ICAMs), y con proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y laminina⁷⁷⁻⁸¹. También se demostró que las tetraspaninas exosomales pueden interactuar con las integrinas de las membranas celulares promoviendo la internalización selectiva de las vesículas por determinadas células^{82,83}.

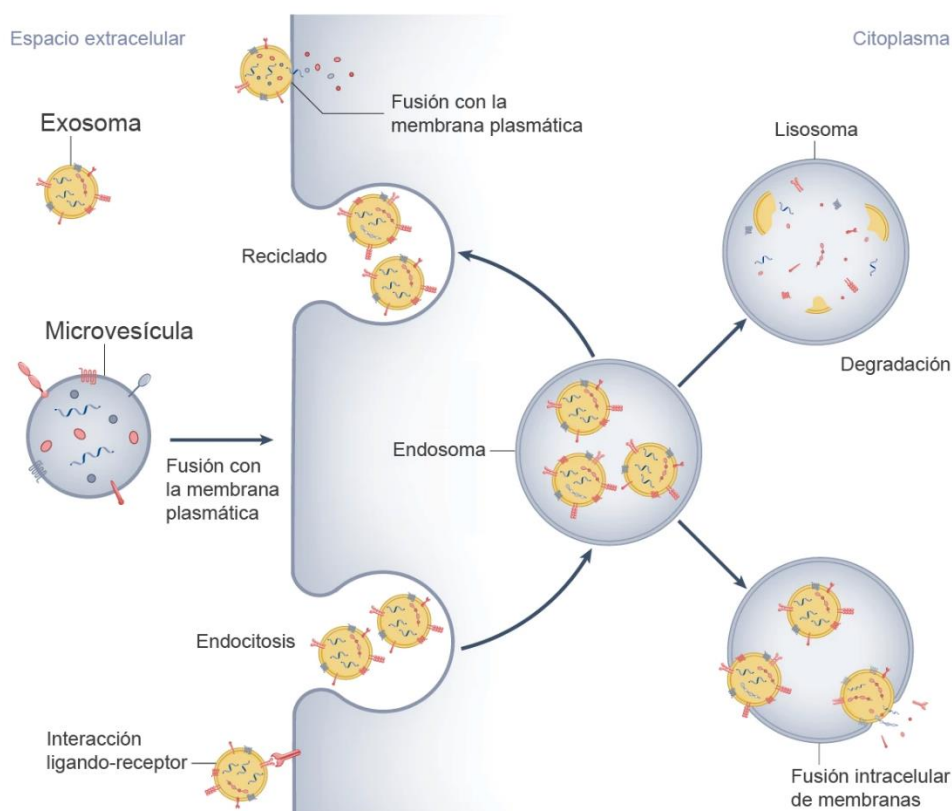


Figura 14: Internalización de las vesículas extracelulares.

Representación de algunos mecanismos por los cuales las células receptoras pueden incorporar a las vesículas extracelulares en su totalidad o al contenido de las mismas. Adaptación⁷⁵.

Entre las diversas macromoléculas que suelen estar presentes en los exosomas se encuentran proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos (**figura 15**). Las principales proteínas incorporadas a los exosomas son de la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), que suelen ser utilizadas como marcadores para la identificación de este tipo de vesículas; miembros de los complejos ESCRT, como la proteína de susceptibilidad a tumores 101 (TSG101), o moléculas accesorias como la proteína X de interacción con ALG2 (ALIX); integrinas; proteínas de choque térmico (Hsp); receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (SNARE); actina; y flotilinas⁸⁴⁻⁸⁶. Mientras que las Hsps, CD63, proteínas ESCRT y componentes del citoesqueleto suelen ser comunes en la gran mayoría de los exosomas, otras proteínas como las de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II son específicas dependiendo del tipo de célula secretora⁸⁷. La membrana de los exosomas consta de componentes lipídicos, como la esfingomielina, el colesterol y las ceramidas, que influyen en la clasificación de la carga, la secreción, la estructura y la señalización de estas vesículas⁸⁸. Dado que no existen marcadores específicos de exosomas y se los caracteriza a partir de moléculas que se encuentran enriquecidas en ellos, frecuentemente se las denomina vesículas símil exosomas (ELVs, *exosome-like vesicles*).

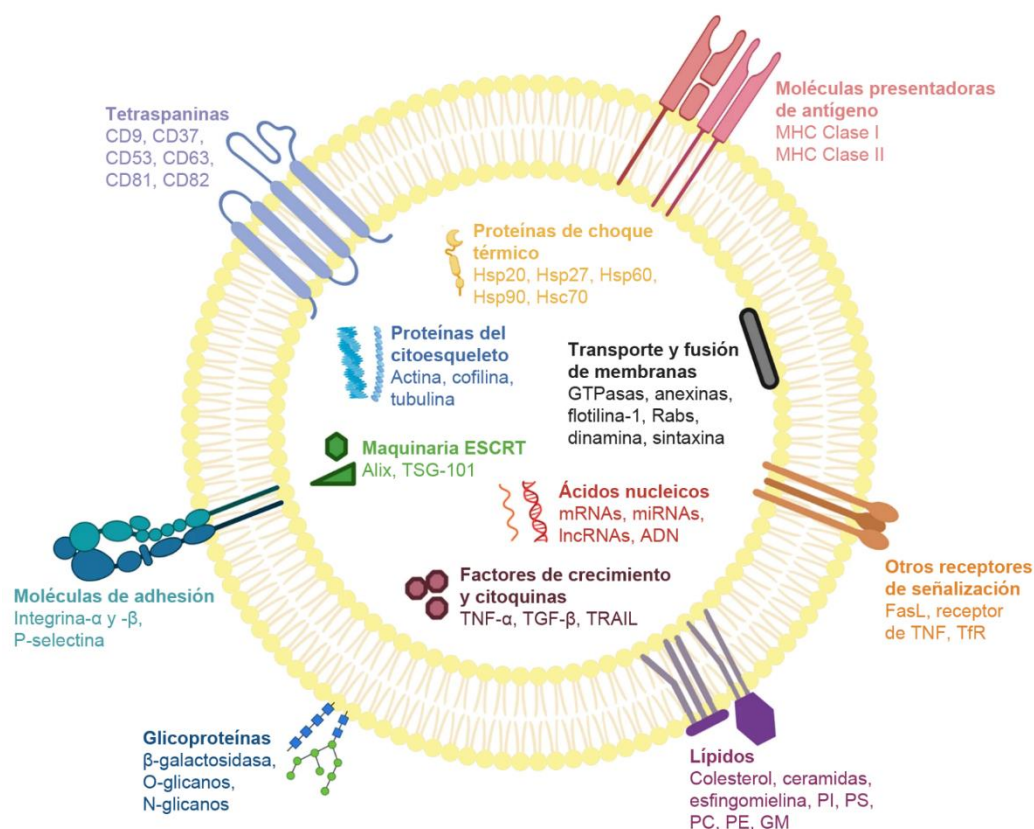


Figura 15: Estructura y composición de los exosomas.

Se muestra un esquema de la estructura y composición de la membrana e interior de los exosomas. PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GM: gangliosidos; Hsp: proteína de choque térmico; ESCRT: proteínas de complejos de clasificación endosómica requeridos para el transporte; TSG: gen de susceptibilidad tumoral; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF; FasL: Fas ligando; Tfr: receptor de transferrina. Adaptación⁸⁹.

Entre los distintos tipos de ácidos nucleicos que transportan los exosomas suele haber una proporción importante de ARNs no codificantes, como micro ARNs (miRNAs) y ARNs largos no codificantes (lncRNAs), que se caracterizan por tener la capacidad de efectuar una importante regulación en las células receptoras (**figura 16**). Los miRNAs son transcritos por las ARN polimerasas II/III a miRNAs primarios (pri-miRNAs) que son clivados en el nucleoplasma por DGCR8 y Drosha, dando lugar a los precursores de miRNAs (pre-miRNAs). Los pre-miRNAs son enviados al citoplasma por acción de la exportina 5, son procesados por Dicer y la proteína de unión al ARN en respuesta a la transactivación (TRBP), generando un dúplex miRNA/miRNA* en el cual la cadena * es degradada, mientras que la otra se une a argonauta 2 (AGO2) que es la proteína principal del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Los miRNAs, como parte del complejo RISC, se unen a sitios específicos de las regiones 3' no traducidas (3' UTR) de los ARNs mensajeros (mRNAs), denominados elementos de respuesta a miRNAs (MREs) e inducen una regulación génica a nivel post-transcripcional⁹⁰. En cambio, los lncRNAs tienen una biogénesis similar a la de los mRNAs, donde muchos sufren el agregado del 5' *cap*, *splicing* y son poliadenilados. Sus funciones pueden ser en *cis*, inhibiendo o activando la transcripción de genes al interactuar con factores de transcripción (TF), inducir modificaciones epigenéticas de la cromatina o cambiar la arquitectura del ADN formando bucles cromosómicos; también pueden actuar en *trans*

interaccionando con proteínas nucleares o participando del ensamblado de los *paraspeckles*. Fuera del núcleo, muchos lncRNAs inhiben miRNAs al secuestrarlos, actuando como esponjas de miRNAs, se unen a proteínas o interaccionan con mRNAs, induciendo la activación o represión de su traducción⁹¹.

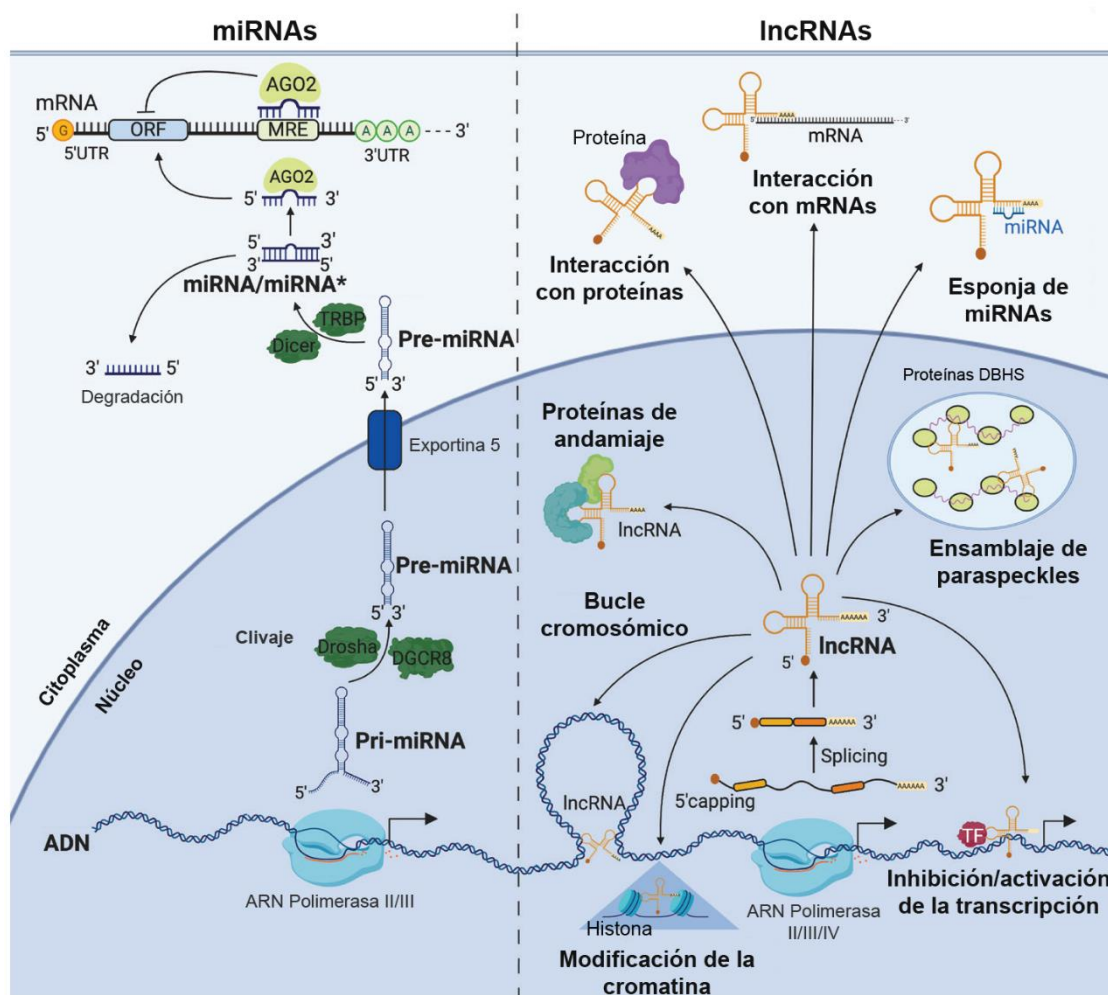


Figura 16: Biogénesis y función de miRNAs y lncRNAs.

Representación de los pasos de transcripción y procesamiento de miRNAs y lncRNAs, y sus funciones regulatorias. TF: factor de transcripción; ORF: marco abierto de lectura; MRE: elemento de respuesta a miRNAs. Adaptación⁹⁰.

1.7. Exosomas en cáncer.

El tipo celular de origen y las condiciones a las que las células se encuentran expuestas determinan el contenido y la cantidad de exosomas que son liberados. En consecuencia, las características y funciones de estas vesículas cambian dinámicamente según las modificaciones que puedan ir sufriendo las células que las producen⁹². Entre la gran variedad de mecanismos en los que se encuentran involucrados los exosomas, se destaca su rol como mediadores de la comunicación entre células tumorales y su microambiente, tanto a nivel local como a sitios distantes; favoreciendo el desarrollo y la progresión del cáncer (**figura 17**)^{93,94}. Se demostró que los exosomas derivados de tumores están implicados en la modulación de la angiogénesis, un proceso

clave para la supervivencia, crecimiento y diseminación tumoral. Este proceso favorece la formación de vasculatura nueva y promueve un aumento en la permeabilidad vascular al dañar el endotelio, lo cual facilita el establecimiento de metástasis⁹⁵⁻⁹⁷.

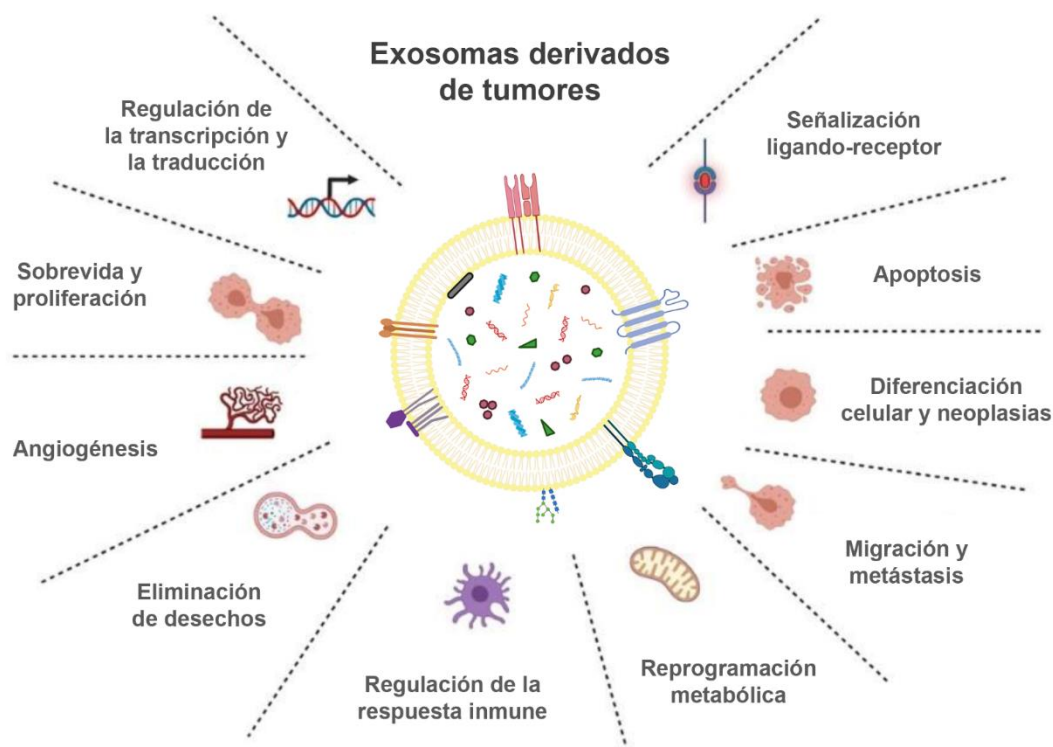


Figura 17: Función de los exosomas en cáncer.

En la figura se muestran diferentes mecanismos descriptos por los cuales los exosomas participan en el desarrollo y progresión tumoral. Adaptación^{89,92}.

Las células tumorales son capaces de secretar exosomas para inducir un entorno inmunológicamente no reactivo y preparar un microambiente pre-metastásico favorable para su crecimiento en órganos distantes⁹⁸⁻¹⁰⁴. También se demostró que los exosomas están involucrados en el organotropismo de las metástasis de determinados tipos tumorales¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Además, al actuar sobre otras células tumorales, los exosomas derivados de tumores pueden generar un incremento en las capacidades migratorias e invasivas, induciendo el fenómeno de transición epitelio-mesenquimal por el cual las células adquieren mayor plasticidad y resistencia¹⁰⁹⁻¹¹¹. Asimismo, los exosomas liberados por las células del microambiente tumoral, como fibroblastos asociados a tumores, células estromales y células del sistema inmune, también cumplen un papel importante en distintas etapas de la progresión tumoral y en la resistencia a terapias (**figura 18**)¹¹²⁻¹¹⁵.

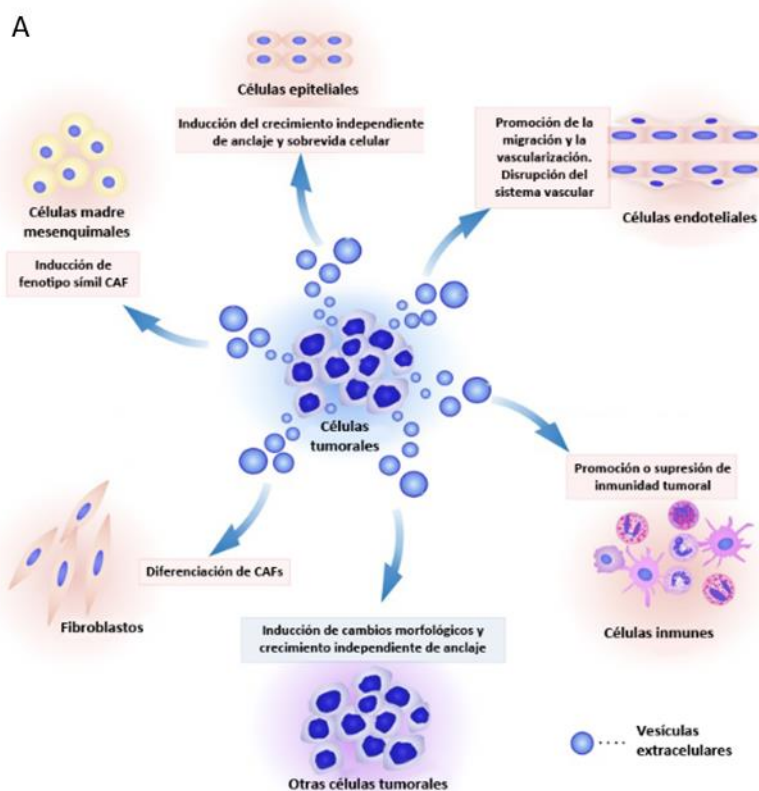
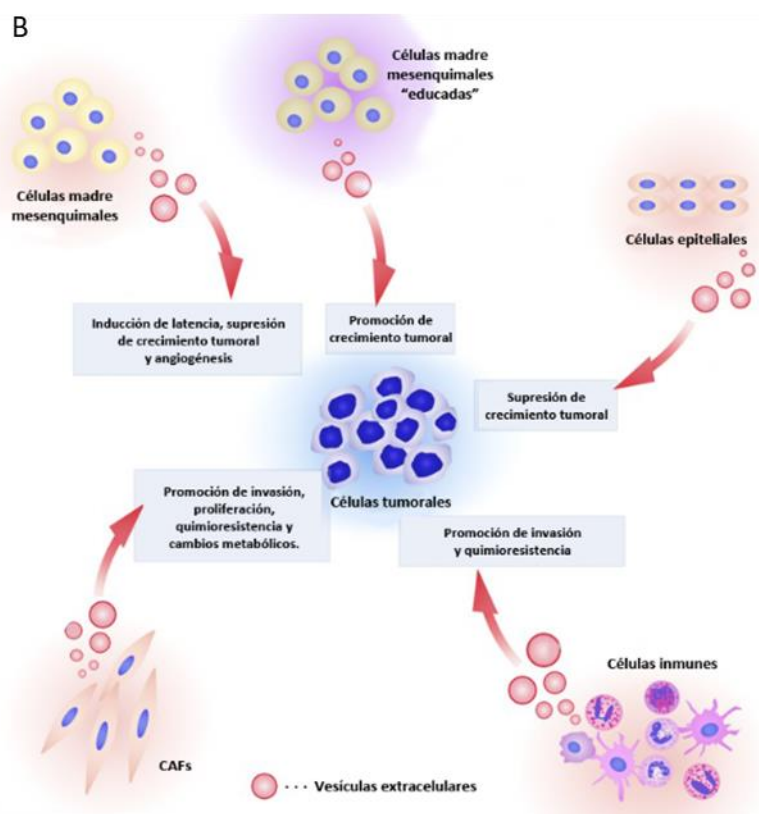


Figura 18: Comunicación intercelular por exosomas entre las células tumorales y las células del microambiente tumoral.

En el esquema se muestra cómo los exosomas secretados por las células tumorales pueden modificar el fenotipo de las células del microambiente tumoral (A). También se esquematiza cómo las células del microambiente tumoral pueden modular la proliferación y progresión del tumor (B). CAF: fibroblasto asociado a cáncer. Adaptación¹¹⁶.



Particularmente, en el caso del cáncer de próstata se reportó que los exosomas derivados de los tumores inducen la progresión de la enfermedad tanto a corta distancia influenciando a las propias células tumorales, como en sitios distales alterando la fisiología de órganos y tejidos blanco^{117,118}. Se demostró que los exosomas liberados por células de cáncer de próstata bajo condiciones de hipoxia pueden inducir un fenotipo semejante al de células más indiferenciadas (*stemness*) y promover la capacidad de invasión en células tumorales prostáticas *naïve*; mientras que en el microambiente pre-metastásico producen un aumento en los niveles de metaloproteinasas de matriz, fibronectina y colágeno^{119,120}. Adicionalmente, se describió que los exosomas derivados de células de cáncer de próstata pueden transferir piruvato quinasa M2 a las células estromales de la médula ósea, promoviendo la formación del nicho pre-metastásico óseo al regular la producción de CXCL12 de manera dependiente de HIF-1 α , lo que facilita la migración y el crecimiento tumoral en el hueso¹²¹. También se observó que los exosomas derivados de líneas celulares de cáncer de próstata pueden favorecer la diferenciación y actividad de osteoblastos a través de la fosfolipasa D2¹²², y que pueden promover la osteoclastogénesis *in vitro* e *in vivo* al contener factores osteolíticos y regular los niveles de colágeno tipo I (COL1A1) mediante el transporte del miR-92a-1-5p^{123,124}. Por otra parte, se demostró que los exosomas de células de cáncer de próstata colaboran con la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales¹²⁵.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. *Hipótesis.*

En base a los antecedentes descriptos, el presente trabajo de tesis propone que los exosomas liberados por las células tumorales prostáticas preparan el nicho metastásico óseo mediante el transporte de diversas biomoléculas y que, además, estos pueden ser utilizados como biomarcadores pronósticos de la enfermedad metastásica y/o como posibles blancos para retrasar o eliminar la progresión y metástasis.

2.2. *Objetivo general.*

Estudiar la comunicación intercelular entre las células tumorales prostáticas y las células óseas, centrándose en la comunicación a través de vesículas símil exosomas (ELVs), e identificar mecanismos moleculares involucrados en esta interacción intercelular.

2.3. *Objetivos específicos.*

- 2.3.1. Aislar y caracterizar las ELVs derivadas de la línea celular PC3 proveniente de una metástasis ósea de un tumor prostático humano.
- 2.3.2. Evaluar *in vitro* el efecto del tratamiento con las ELVs de PC3 sobre dos líneas celulares precursoras óseas (MC3T3 y Raw264.7).
- 2.3.3. Estudiar el contenido de ARNs de las ELVs de PC3 y predecir *in silico* la regulación que ejercerían en sus células receptoras.
- 2.3.4. Realizar un análisis bioinformático de abundancia de ARNs en vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de próstata provenientes de datos transcriptómicos de repositorios públicos y predecir la red de regulación en la que estarían involucrados en el tejido óseo.
- 2.3.5. Analizar la relevancia clínica de los ARNs candidatos seleccionados anteriormente.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivo celular.

3.1.1. Líneas celulares.

- **PC3 (ATCC®CRL-1435™)**: derivada de una metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático humano grado IV¹²⁶. Es insensible a andrógenos y no expresa PSA. Su perfil de crecimiento en hueso es osteolítico.
- **MC3T3 (ATCC®CRL-2593™)**: Línea celular de precursores osteoblásticos derivada de calvaria de ratón C57BL/6¹²⁷.
- **Raw264.7 (ATCC®TIB-71™)**: línea celular monocítica/macrofágica de ratón BALB/c con capacidad de crecer como precursores de osteoclastos o diferenciarse en osteoclastos multinucleados frente al tratamiento con RANKL¹²⁸.

3.1.2. Condiciones de crecimiento.

Las células PC3 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU) suplementado con L-glutamina, bicarbonato de sodio 0,2% m/v, suero fetal bovino 10% (SFB) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml). Al alcanzar un 80% de confluencia, se repicaron realizando un lavado con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 10,1 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4), una incubación con tripsina durante 3 min en estufa a 37°C, y una dilución y posterior resiembra con medio de cultivo fresco.

Las células MC3T3 se mantuvieron en medio α-MEM (Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU) suplementado con SFB 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml). Al alcanzar un 80% de confluencia, se repicaron realizando un lavado con PBS, una incubación con tripsina con 0,25% EDTA durante 3 min en estufa a 37°C, y una dilución y posterior resiembra con medio de cultivo fresco.

Las células Raw264.7 se crecieron en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU) suplementado con SFB 5% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml). Al alcanzar un 80% de confluencia, se repicaron utilizando un *scraper*, y realizando una dilución y posterior resiembra con medio de cultivo fresco.

Todos los cultivos se realizaron en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

3.1.3. Preservación criogénica.

A partir de cultivos celulares con una confluencia aproximada del 80%, las células fueron cosechadas, se realizó una centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min y se las resuspendió en SFB conteniendo dimetil sulfoxido (DMSO) 10% (v/v). Se fraccionaron en alícuotas de 1 ml en criotubos y se las congeló a -80°C en un dispositivo Nalgene Mr. Frosty conteniendo isopropanol. Transcurridas 24 h, los viales de congelación fueron transferidos a un tanque de nitrógeno líquido.

3.2. Estudio de comunicación intercelular en co-cultivo indirecto de células PC3 y MC3T3 o Raw264.7.

Al inicio del experimento, las células PC3 en suspensión fueron marcadas con un pulso de CFSE -éster de succinimidil-carboxifluoresceína- (2,5 mM; cat. 600121; Cayman, Ann Arbor, Michigan, EEUU). Brevemente, se colocó el reactivo en la tapa de un tubo Falcon de 15 ml y se mezcló rápidamente por inversión con la suspensión de células para que la tinción se realice homogéneamente, y se incubó la suspensión celular por 5

min a 37°C. Luego, para eliminar el excedente de CFSE, se agregó RPMI con SFB 10% (c.s.p 15 ml), se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado adicional con PBS. El *pellet* de células fue resuspendido en medio RPMI con 10% de SFB y se sembraron 100.000 células en insertos para placas de seis pocillos (cat. 353090; Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU), los cuales poseen en su base poros de 0,4 µm, permitiendo el paso de moléculas pequeñas. Ese mismo día se sembraron las células MC3T3 o Raw264.7 en placas de 6 pocillos con vidrios de 12 mm de diámetro (200.000 células/pocillo para MC3T3; 300.000 células/pocillo para Raw264.7). Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo tanto de los insertos como de los pocillos, se realizó un lavado de las células con PBS y se colocaron los insertos con PC3 marcadas con CFSE en los pocillos con las células óseas sin marcar. Se agregaron 2 ml por pocillo y 2 ml por inserto de medio de cultivo (α-MEM para MC3T3 y DMEM para Raw264.7) suplementado con antibióticos y SFB 2%. De esta manera, ambas poblaciones celulares comparten el medio de cultivo pero no están en interacción física directa. Como control de no co-cultivo/tratamiento, se cultivaron las células óseas en las mismas condiciones pero en ausencia de PC3. Luego de 48 h de co-cultivo, las células MC3T3 y Raw264.7 fueron lavadas suavemente con PBS y fijadas con una solución 4% m/v de paraformaldehído (PFA) durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, luego de lavar los vidrios con PBS, los mismos fueron montados en un portaobjetos con 2 µl de Mowiol 488 (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) y guardados a 4° C en oscuridad hasta su uso. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus Fluoview FV1000, con un objetivo 60X de inmersión en aceite (Centro de Microscopía de Fluorescencia Gregorio Weber, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires), y se analizó la presencia de marca de CFSE en las células originalmente no marcadas. La presencia de marca en las células MC3T3 y Raw264.7 luego del co-cultivo se interpreta como En la **figura 19** se esquematiza el procedimiento.

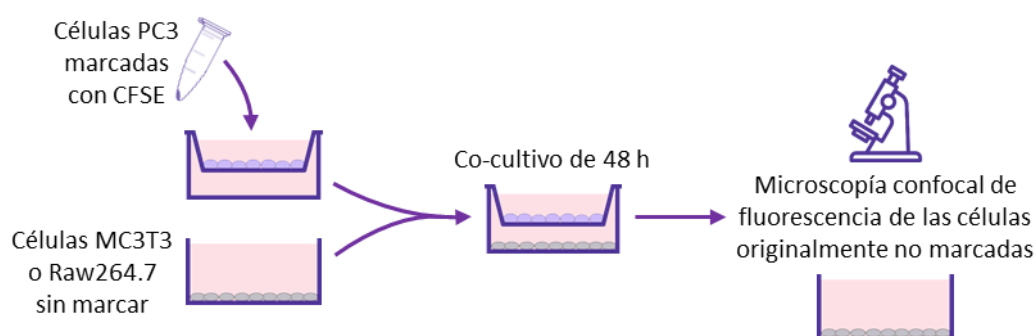


Figura 19. Esquema del ensayo de co-cultivo entre células PC3 marcadas con CFSE y células precursoras óseas MC3T3 o Raw264.7.

La figura esquematiza el procedimiento de co-cultivo y análisis de las células MC3T3 y Raw264.7 originalmente no marcadas mediante microscopía de fluorescencia confocal. En la microscopía se buscó la presencia de señal de CFSE en las células MC3T3 y Raw264.7, lo que indicaría una comunicación intercelular con las células PC3.

3.3. Obtención y caracterización de vesículas símil exosomas (ELVs).

3.3.1. Aislamiento de las ELVs.

Se sembraron 500.000 células PC3 en placas de 10 mm con medio RPMI completo como se indicó anteriormente. Al día siguiente, se descartó el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se agregó RPMI

con antibióticos y 2% de SFB sin vesículas extracelulares, lo cual se realizó mediante ultracentrifugación a 110.000 g durante 18 h¹²⁹. Luego de 48 h de cultivo, se recolectó el medio condicionado de crecimiento de las PC3 y se aislaron las vesículas extracelulares mediante centrifugaciones diferenciales seguidas de una ultracentrifugación, realizando todos los pasos a 4°C. El primer paso de centrifugación a 800 g por 5 min permitió remover restos celulares (*pellet* 1) y el sobrenadante resultante fue centrifugado a 4.000 g durante 20 min para eliminar organelas y cuerpos apoptóticos (*pellet* 2). El sobrenadante fue centrifugado a 15.000 g por 60 min, permitiendo remover las vesículas de 100-1000 nm de diámetro (*pellet* 3). Por último, la fracción correspondiente a vesículas de menor tamaño (30-100 nm de diámetro) entre las que se encuentran las ELVs (*pellet* 4) fue obtenida por ultracentrifugación a 110.000 g por 90 min (ultracentrífuga Hitachi Koki CP-90NX, rotor de ángulo fijo P90AT). Se realizó un lavado del *pellet* 4 con PBS y se repitió el paso de ultracentrifugación. En la **figura 20** se esquematiza el procedimiento.

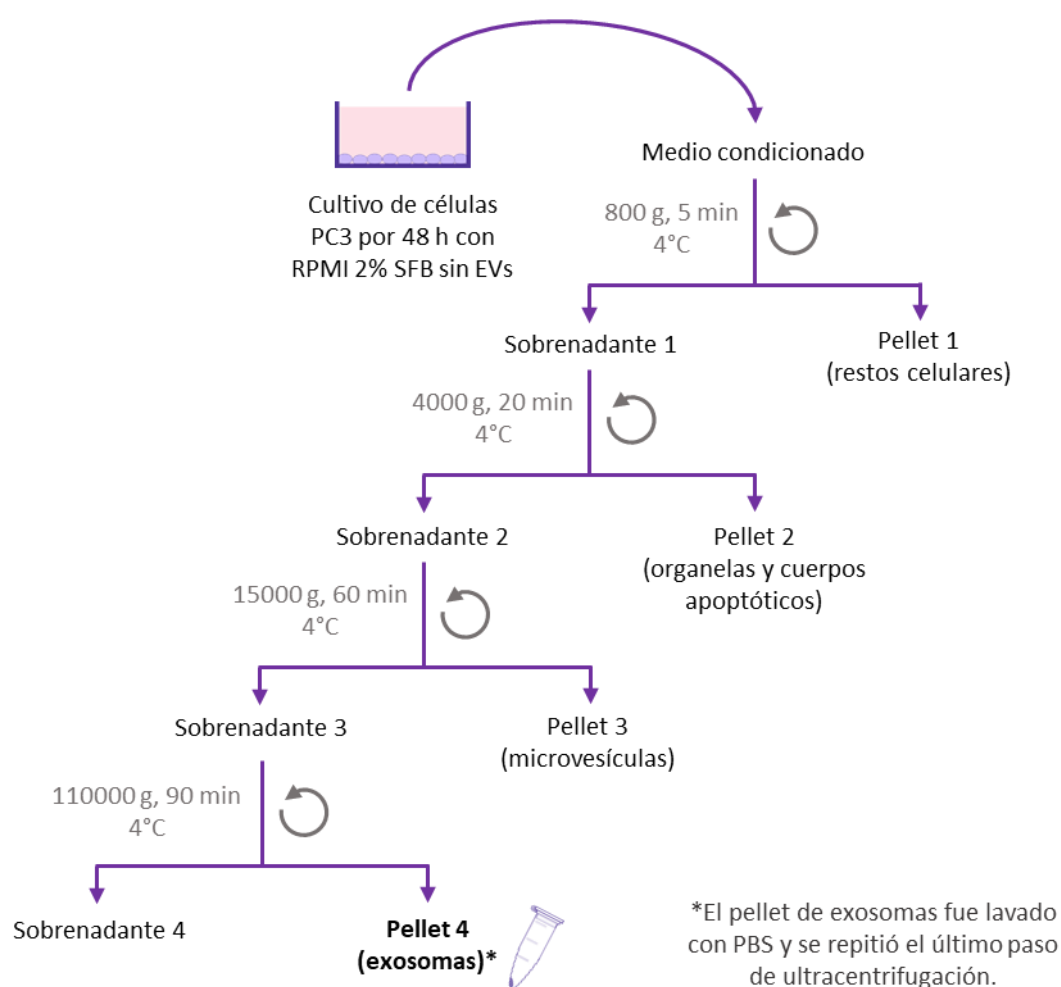


Figura 20. Protocolo del aislamiento de vesículas extracelulares derivadas de células PC3.

Partiendo del medio condicionado de un cultivo de PC3 de 48 h en RPMI con 2% de SFB sin vesículas extracelulares (EVs), se realizó una serie de centrifugaciones diferenciales seguidas de una ultracentrifugación para obtener una fracción enriquecida en ELVs (*pellet* 4).

Finalmente, dependiendo del ensayo que se fuera a realizar posteriormente, las ELVs fueron resuspendidas en PBS o en el buffer correspondiente. En todos los ensayos se utilizaron fracciones de vesículas frescas, de no más de una semana desde su aislamiento y conservadas a 4°C.

3.3.2. Citometría de flujo.

Se utilizó la citometría de flujo para caracterizar las vesículas extracelulares de PC3. Debido a que el tamaño de las ELVs es entre 30 y 100 nm, el cual es menor al límite de detección de los citómetros convencionales (~200 nm), las vesículas deben acoplarse a esferas magnéticas para aumentar su tamaño. Se utilizaron esferas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD63 (cat. 10606D, Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU) para capturar las ELVs ya que la proteína CD63 se considera un marcador exosomal. Además, para aumentar la certeza de la caracterización, se utilizó un anticuerpo anti-CD81 acoplados al fluorocromo ficoeritrina (PE; cat. sc-7637 PE; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU), otra proteína de localización casi exclusiva de exosomas.

Brevemente, se incubaron 10 µl de suspensión del *pellet 4* (ELVs) de PC3 en PBS con 5 µl del reactivo con esferas anti-CD63 durante 16 h a 4°C en agitación. Luego de la incubación, se agregaron 500 µl de PBS con 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA) filtrados con filtro de 0,22 µm, se mezcló realizando un *spin* de 5 seg y se colocó el tubo en una estructura con imán por 1 min para separar las esferas magnéticas unidas a vesículas extracelulares CD63+. Se descartó el líquido, se agregaron 50 µl de una dilución 1:50 de anticuerpo anti-CD81-PE en PBS-BSA y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Se colocaron 200 µl más de PBS-BSA, se mezcló por agitación y se detectó la presencia de complejos de esferas magnéticas anti-CD63:vesículas CD63+/CD81+:anticuerpos anti-CD81-PE (**figura 21**) usando un citómetro BD FACS Aria II, BD Biosciences (Servicio de Citometría de Flujo, FCEN-UBA). Se realizaron controles colocando solo las esferas anti-CD63 (control negativo de autofluorescencia), y esferas anti-CD63 con anticuerpos anti-CD81-PE (control de unión inespecífica).

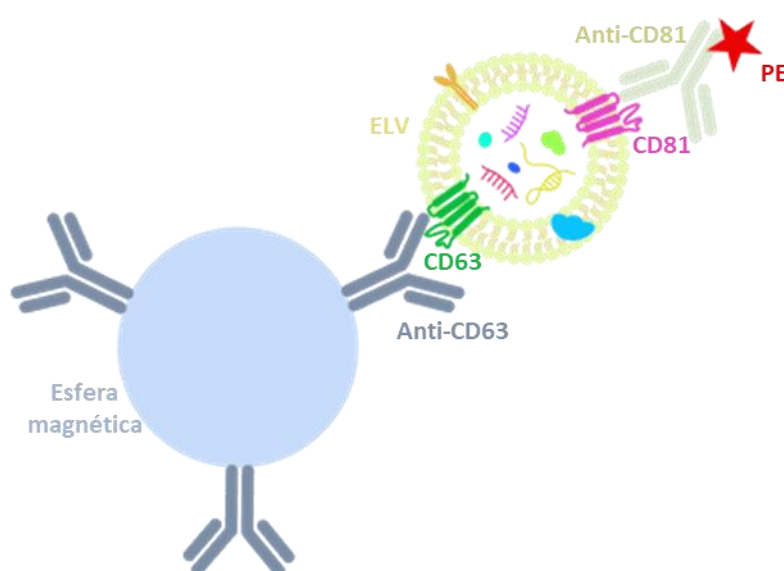


Figura 21. Esquema del sistema de detección de ELVs.

En la figura se muestra el sistema utilizado para la identificación de ELVs aisladas de los medios de cultivo de PC3. Se puede observar la esfera magnética acoplada a anticuerpos anti-CD63 (celeste), una ELV CD63+/CD81+ (amarillo) y el anticuerpo anti-CD81-PE (gris). Este complejo es luego detectado por citometría de flujo.

3.3.3. Western Blot.

3.3.3.1. Extracción de proteínas.

Luego de retirar el medio de cultivo para el aislamiento de las vesículas, las células PC3 fueron lavadas dos veces con PBS frío conteniendo inhibidores de fosfatasas (NaF 0,5 μ M y ortovanadato de sodio 0,8 mM) e inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*; Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri, EEUU). Se cosecharon las células con un *scraper*, se centrifugaron a 2.500 rpm durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* de células se resuspendieron en *buffer* RIPA (Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 20 mM pH 8; deoxicolato de sodio 1% v/v; SDS 0,1% m/v; Tritón X-100 1% v/v) con inhibidores de fosfatasas y proteasas, se incubaron en hielo durante 20 min y se centrifugaron a 12.500 rpm durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes conteniendo las proteínas se conservaron hasta posterior uso a -80°C.

Se realizó el mismo procedimiento con las ELVs aisladas y resuspendidas en *buffer* RIPA.

3.3.3.2. Determinación de la concentración de proteínas.

Se determinó la concentración proteica de cada muestra utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA 98% y CuSO₄ 2%; Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri, EEUU). La curva estándar se realizó utilizando diluciones de un estándar de BSA disuelto en *buffer* de lisis RIPA. Se colocaron 10 μ l de cada muestra en una placa de 96 pocillos por triplicado y se agregaron 200 μ l de BCA/CuSO₄. Se incubó durante 30 min a 37°C, midiéndose luego la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (*Glomax Multi Detection System*; Promega, Madison, Wisconsin, EEUU). La concentración proteica de cada muestra se determinó utilizando la curva de calibración de BSA.

3.3.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), transferencia a membrana de nitrocelulosa e inmunodetección de proteínas.

Las proteínas purificadas y cuantificadas fueron mezcladas y desnaturalizadas en *buffer* de siembra (Tris-HCl 10 mM pH 8, SDS 1%, glicerol 4%, sacarosa 0,146 M, azul de bromofenol y β -mercaptoetanol 5%) durante 5 min a 95°C en una concentración aproximada de 10 μ g proteína en 30 μ l. Se sembraron 30 μ l por calle de un gel de poliacrilamida de un sistema vertical (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EEUU). Adicionalmente, se sembró una calle con un marcador de peso molecular (*Blue Plus IV Protein Marker*, TransGen Biotech, Beijing, China). Las muestras se resolvieron mediante una corrida en *buffer* de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% m/v) a un voltaje constante de 90 V a lo largo del gel concentrador de poliacrilamida 5% (Tris 0,128 M, pH=6,8; SDS 0,1%; Acrilamida: Bisacrilamida (29: 1); APS 0,1 % v/v y TEMED 0,2 % v/v) y luego a 100 V en el gel separador de poliacrilamida 10% (Tris 0,4 M (pH 8,8); Acrilamida: Bisacrilamida (29: 1); SDS 0,1%; APS 0,1% v/v y TEMED 0,24% v/v). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EEUU) a un amperaje constante de 250 mA durante 90 min en *buffer* Towbin (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 3,5 mM; pH 8,3 y metanol 20% v/v).

La membrana se incubó en *buffer* TBS-T (NaCl 150 mM; KCl 2,68 mM; Tris base 24,7 mM; detergente Tween-20 0,05% v/v; pH 7,4) conteniendo 5% m/v de leche descremada en polvo durante 40 min a temperatura ambiente y con agitación suave para inhibir la unión inespecífica de los anticuerpos. Luego, se realizaron lavados con TBS-T y se incubó por 16 h a 4°C y con agitación suave en presencia de la dilución apropiada del anticuerpo primario en TBS-T: anti-CD81-PE (1:50; acoplado al fluorocromo PE; cat. sc-7637 PE; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU), anti-flotilina-1 (1:100; sc-74566; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU) y anti-TSG101 (1:50; sc-7964; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUU). Se hicieron 3 lavados de

15 min cada uno de la membrana con TBS-T. En las membranas que se buscaba visualizar a flotilina-1 y TSG101 se agregó el anticuerpo secundario anti ratón (1:1000; cat. 7076S, Cell Signaling; Danvers, Massachusetts, EEUU) acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, la membrana se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave y, posteriormente, se efectuaron 3 lavados durante 10 min cada uno con TBS-T.

Las membranas fueron reveladas con el reactivo *EasySee Western Blot* basado en HRP (TransGen Biotech, Beijing, China) para flotilina-1 y TSG101, y mediante la detección de fluorescencia de PE para CD81. La visualización de las membranas se realizó utilizando el analizador de imágenes *Amersham Imager 600* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EEUU).

3.3.4. Microscopía electrónica de transmisión.

Se depositaron 10 µl de una suspensión de ELVs en PBS sobre una membrana hidrofílica LRW con grilla. Luego de 10 min, se realizó una tinción con una solución acuosa con 2% de acetato de uranilo por 3 min, seguida de lavados con agua bidestilada y secado a temperatura ambiente. Las características morfológicas se visualizaron utilizando un microscopio Zeiss EM109T con cámara digital Gatan ES1000W (Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica (LANAIS-MIE), UBA-CONICET).

3.3.5. Estudio del contenido de ARNs en las ELVs por *microarrays* de expresión.

Se aislaron las ELVs del medio de 48 h de cultivo de PC3 como se describió arriba. El *pellet* de ELVs obtenido por ultracentrifugación se resuspendió en 100 µl del reactivo *Quick-Zol* (Kalium Technologies; Bernal, Buenos Aires, Argentina), se agitó por 5 min y el lisado se congeló a -80°C hasta su posterior uso. Para la extracción, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para asegurar la disociación de los complejos núcleo-proteicos, y se agregaron 20 µl de cloroformo. Se agitó vigorosamente y se dejó reposar en hielo durante 3 min. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C. Se pasó la fase acuosa a un nuevo tubo y el ARN total se precipitó agregando 50 µl de isopropanol e incubando 16 h a -20°C. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 150 µl de etanol 75% v/v, se centrifugó a 7.600 rpm durante 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y el *pellet* se secó a 50°C por 3 min. El ARN total se resuspendió en 6 µl de agua libre de nucleasas y se rehidrató incubando durante 10 min a 55°C. La concentración y pureza del ARN obtenido se determinaron por absorbancia a 260 nm y 280 nm en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU).

Posteriormente, las muestras de ARN total fueron re-precipitadas agregando 1/10 su volumen de NaAc 3M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol absoluto agitando vigorosamente ya que el ARN precipitado es más estable que el ARN en solución y tiene mejor conservación, incluso a temperatura ambiente. Los ARNs precipitados fueron conservados a -80°C hasta ser enviados a España con hielo seco.

En España, los ARNs fueron centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4°C, se lavaron los *pellets* con 150 µl etanol 75% y se centrifugaron nuevamente a 12.000 g por 5 min a 4°C. Se retiraron los sobrenadantes, se dejaron secar los *pellets* durante 5-10 min en hielo, se resuspendieron en 8 µl de PBS y se los purificó con columnas *RNA Clean & Concentrator-5* (cat. R1015, Zymo Research, Irvine, California, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron cuantificadas usando la plataforma de electroforesis automatizada *Agilent 2100 Bioanalyzer* y el kit *Agilent RNA 6000 Pico* (cat. 5067-1513, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) y se hibridaron a *microarrays* de expresión *Clariom™ D* de humano con el kit *GeneChip WT Pico Reagent* (cat. 902922 y cat. 902622, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU) en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CiC-IBMCC), Universidad de Salamanca (USAL) y Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

Salamanca, España. Brevemente, en el procesamiento de las muestras se generó ADN de cadena simple biotinilado a partir del ARN total (poliadenilados y no poliadenilados), proporcionando una cobertura completa del transcriptoma. Tras 16-18 h de hibridación a 45°C, tinciones y lavados, se procedió al escaneado de los *microarrays Clariom™ D* que contienen más de 540.000 transcritos.

3.4. Evaluación del efecto del tratamiento con vesículas extracelulares aisladas de PC3 sobre MC3T3 y Raw264.7.

3.4.1. Exposición de células MC3T3 y Raw264.7 a ELVs de PC3.

Se sembraron células MC3T3 o Raw264.7 con los medios de cultivo habituales para su mantenimiento. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo, se hizo un lavado con PBS y se agregó medio fresco (α -MEM a las MC3T3 y DMEM a las Raw264.7) con antibióticos, 2% de SFB sin vesículas extracelulares, y adicionado con ELVs aisladas de PC3 como se describió anteriormente, o PBS como control de no exposición.

Debido a que no hay métodos estandarizados confiables para la cuantificación de vesículas extracelulares, para estos tratamientos se consideró que, como se partió siempre de la misma cantidad de células PC3 y condiciones de cultivo, y que el protocolo de aislamiento de vesículas extracelulares estaba estandarizado, en todos los aislamientos se obtuvieron cantidades similares de ELVs. Esta es una limitación que puede introducir variabilidad en los resultados.

Luego de los tratamientos de 24 h de exposición a las ELVs de PC3, se evaluaron distintos parámetros biológicos en las células MC3T3 y Raw264.7 (**figura 22**).

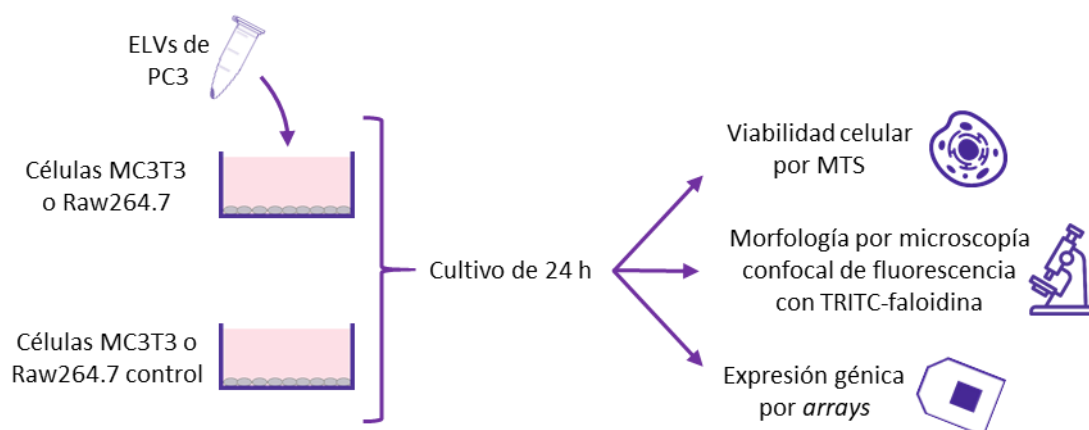


Figura 22. Diseño experimental para evaluar el efecto de las vesículas extracelulares de PC3 sobre las células receptoras óseas.

En la figura se muestra un esquema de la metodología empleada y los parámetros celulares analizados sobre las células MC3T3 y Raw264.7.

3.4.2. Ensayo de viabilidad celular por MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2h-tetrazolio).

Utilizando el reactivo comercial *CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS) (cat. G5421, Promega, Madison, Wisconsin, EEUU) de acuerdo a las indicaciones del proveedor, se evaluó la viabilidad de las células precursoras óseas en placa de 96 pocillos luego de la incubación con las ELVs de PC3. Al momento de cosechar las células, se realizó un lavado con PBS y se agregaron 100 µl de medio de cultivo fresco sin SFB ni antibióticos junto con 20 µl del reactivo MTS/PMS. Como blanco de reactivos se utilizó medio de cultivo solo. La placa se incubó 2 h en estufa a 37°C con 5% de CO₂ en oscuridad y se midió la absorbancia a 490 nm cada 30 min en un lector de placas (*Glomax Multi Detection System*, Promega, Madison, Wisconsin, EEUU). Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad respecto del control según la fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Abs tratamiento} - \text{Abs blanco}}{\text{Abs control} - \text{Abs blanco}} \times 100$$

En donde las absorbancias (Abs) corresponden al promedio de los triplicados realizados en cada condición.

Los datos se presentan como el promedio $\pm$ desvío estándar (SD) de al menos tres experimentos independientes, a menos que se indique de otro modo. La significancia estadística se determinó con el *software* GraphPad Prism 9, empleando pruebas de t de *student* de muestras no pareadas para comparaciones entre las dos condiciones experimentales.

3.4.3. Estudio de morfología celular por microscopía confocal de fluorescencia.

Se crecieron las células MC3T3 o Raw264.7 en placas de 6 pocillos en las que se había insertado un vidrio de 12 mm de diámetro. Luego del tratamiento con ELVs de PC3 como se describió más arriba, las células fueron lavadas suavemente con PBS y fijadas con una solución 4% m/v de PFA durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, se removió la solución fijadora y se realizaron 3 lavados con PBS. Luego las células se incubaron en una solución permeabilizadora de PBS con 0,05% v/v de tritón X-100 durante 15 min y se lavaron 2 veces con PBS. Posteriormente, se realizó una incubación con una dilución 1:10 de TRITC-faloidina en PBS con 3% de BSA (preparada a partir de una dilución 1:500 en etanol 96% v/v) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó 2 veces con PBS y se incubó con DAPI (1,5 µg/ml) por 10 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Por último, luego de lavar 2 veces con PBS, los vidrios fueron montados en un portaobjetos con 2 µl de Mowiol 488 (Sigma-Aldrich; San Luis, Misuri, EEUU) y conservados a 4°C en oscuridad hasta su uso. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus Fluoview FV1000, con un objetivo 60X de inmersión en aceite (Centro de Microscopía de Fluorescencia Gregorio Weber, FCEN-UBA). Con el programa *ImageJ*, se calcularon los parámetros morfológicos de circularidad y diámetro de Feret en un mínimo de 35 células.

Los datos se presentan como el promedio $\pm$ desvío estándar (SD) de al menos tres experimentos independientes, a menos que se indique de otro modo. La significancia estadística se determinó con el *software* GraphPad Prism 9, empleando pruebas de t de *student* de muestras no pareadas para comparaciones entre las dos condiciones experimentales.

3.5. Análisis del perfil transcripcional en las líneas celulares óseas.

3.5.1. Purificación de ARN total.

Luego de la incubación de las células MC3T3 o Raw264.7 con las ELVs de PC3 como se describió anteriormente, se descartó el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS precalentado a 37°C, se cosecharon las células y se centrifugaron a 2.500 rpm por 5 min. El *pellet* celular obtenido se resuspendió en 300 µl del reactivo Quick-Zol (Kalium Technologies; Bernal, Buenos Aires, Argentina), se agitó por 5 min y el lisado se congeló a -80°C hasta su uso. Para la purificación del ARN total, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para asegurar la disociación de los complejos ácido nucleico-proteína, tras lo cual se agregaron 60 µl de cloroformo. Se agitó y se dejó reposar en hielo durante 3 min. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo se agregaron 150 µl de isopropanol y se dejó precipitar el ARN por 16 h a -20°C. Luego, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, se lavó el *pellet* con 300 µl de etanol 75% v/v y se centrifugó a 7.600 rpm durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el *pellet* se secó a 50°C por 3 min, se resuspendió en 30 µl de agua libre de nucleasas y se rehidrató incubando durante 10 min a 55°C. Las muestras de ARN total se conservaron a -80°C hasta su posterior uso. La concentración y pureza del ARN obtenido se midieron en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU).

3.5.2. Tratamiento con DNAsa.

Con el fin de eliminar potenciales restos de ADN en las muestras de ARN total, se utilizó el *kit RQ1 RNase-Free DNase* (cat. M6101; Promega, Madison, Wisconsin, EEUU). Se colocaron 0,5 µg de ARN total, 1 µl de *RQ1 buffer* y 1 µl de *RQ1 DNase*, se llevó a un volumen final de 10 µl con H₂O libre de RNAsas y se incubó a 37°C por 30 min. Terminada la incubación, se agregó 1 µl de *RQ1 stop solution* y se incubó 10 min a 65°C.

3.5.3. Microarrays de expresión.

Para su envío a España, todas las muestras fueron precipitadas, enviadas, resuspendidas, purificadas y cuantificadas como se describió anteriormente en el punto 3.3.5. En este caso, los ARNs de las células MC3T3 y Raw264.7, se hibridaron en un *microarrays* de expresión *Clariom™ S* para ratón con el *kit GeneChip WT PLUS Reagent* (cat. 902930 y cat. 902281, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU) en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CiC-IBMCC), Universidad de Salamanca (USAL) y Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Salamanca, España. Brevemente, en el procesamiento de las muestras se generó ADN de cadena simple biotinilado a partir del ARN total (poliadenilados y no poliadenilados), proporcionando una cobertura completa del transcriptoma. Tras 16-18 h de hibridación a 45°C, tinciones y lavados, se procedió al escaneado de los *microarrays Clariom™ S* que contienen más de 22.100 genes.

3.6. Análisis bioinformáticos.

3.6.1. Identificación de miRNAs abundantes en las ELVs derivadas de células PC3 a partir de datos de repositorios publicos.

Se realizó una búsqueda de datos de secuenciación del transcriptoma (*RNAseq*) y *microarrays* de expresión en el repositorio público *Gene Expression Omnibus* (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y se descargaron tres *sets* de datos que exploraban el contenido de miRNAs en ELVs derivadas de la línea PC3 (GSE109356¹³⁰, GSE117744¹³¹ y GSE35813¹³², último acceso en abril de 2021). Dentro de cada estudio, se los ordenó de

acuerdo a su abundancia y se seleccionaron los 100 miRNAs con mayores niveles de cada *dataset*. Luego, se continuó el análisis con los 16 miRNAs presentes en los tres subgrupos, identificados mediante la herramienta DeepVenn¹³³ (<https://www.deepvenn.com/>). Se estudiaron las categorías de funciones y enfermedades más significativamente sobre-representadas por dichos 16 miRNAs con la plataforma TAM 2.0¹³⁴ (<http://www.lirmed.com/tam2/>; opción *overrepresentation*). Con la plataforma miRNet 2.0¹³⁵ (<https://www.mirnet.ca/>; *degree cutoff* = 5) se identificaron los lncRNAs y mRNAs blanco de los miRNAs seleccionados anteriormente y se estudiaron las categorías de ontología génica y vías de KEGG significativamente representadas por estos mRNAs ($p < 0,05$) utilizando la plataforma DAVID v6.8¹³⁶ (<https://david.ncifcrf.gov/>). Los resultados para cada categoría tienen asociado un π -valor calculado a partir del p y las veces de enriquecimiento (*fold enrichment*) de cada categoría en particular como $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) * [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$.

3.6.2. Estudio del contenido de ARNs en las ELVs derivadas de células PC3 y predicción de la la regulación que ejercerían en sus células receptoras

El pre-procesamiento de los datos crudos obtenidos de los *microarrays* de expresión ClariomTM D de humano (archivos .CEL) se realizó utilizando la plataforma Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0.2 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU), la cual implementa el paquete de Bioconductor Limma¹³⁷. Para el análisis se seleccionaron las opciones "Expression (Gene + Exon)" en Analysis Type y "Gene - SST RMA" en Summarization, obteniéndose 135.750 transcritos de los cuales se eliminaron aquellos que no tenían símbolo de gen asociado, quedando 86.161. También se eliminaron: i) transcritos con un promedio $\text{Log}_2(\text{señal}) < 3,75$ entre las tres muestras independientes de ELVs, calculado con la función *shorth* del paquete de Bioconductor *genefilter* (versión 1.76.0)¹³⁸; ii) transcritos predichos por la base de datos AceView; iii) transcritos que no tenían nombre de gen asociado ni eran descriptos como "novel transcript"; y iv) transcritos que mapeaban a más de un gen. Luego de todos estos filtros, se obtuvieron 29.588 transcritos para el análisis final; los cuales fueron clasificados en grupos y subgrupos de acuerdo con la información del HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)¹³⁹, incluyendo además a los ARNs circulares (circRNAs) dentro del grupo de ARNs no codificantes.

Se seleccionaron los 30 lncRNAs con mayor abundancia ($\text{Log}_2(\text{señal})$ media), se buscaron sus mRNAs blanco en la base de datos ENCORI¹⁴⁰ (<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) y con ellos se realizó un análisis de ontología génica y vías de KEGG con la plataforma DAVID v6.8¹³⁶ (<https://david.ncifcrf.gov/>), considerando significativamente representadas a las categorías con $p < 0,05$ para las cuales se calculó un π -valor a partir del p y las veces de enriquecimiento (*fold enrichment*) como $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) * [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$.

3.6.3. Expresión génica en células MC3T3 y Raw264.7 tratadas con ELVs de PC3

El análisis a partir de los datos crudos obtenidos al emplear los *microarrays* de expresión Clariom S de ratón (archivos .CEL) se realizó utilizando la plataforma Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0.2 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific / Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EEUU), la cual implementa el paquete de Bioconductor Limma¹³⁷, seleccionando las opciones "Expression (Gene)" en Analysis Type y "Gene - SST RMA" en Summarization.

Con los genes identificados como sub- o sobre-expresados (módulo de las veces de cambio (*fold change*) $> 1,2$ y $p < 0,05$) se realizó un análisis de ontología génica ($p < 0,05$; resultados expresados como π -valor = $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) * [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$).

de enriquecimiento)* $[-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$) con la plataforma DAVID v6.8¹³⁶ (<https://david.ncifcrf.gov/>).

3.6.4. ARNs diferencialmente abundantes en vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de próstata y predicción de la red regulatoria que modularían en las células óseas.

Se descargó el set de datos GSE71008¹⁴¹ de GEO (último acceso en diciembre de 2021), que posee información de los niveles de ARNs contenidos en vesículas extracelulares aisladas de plasma de pacientes con cáncer de próstata ($n = 36$; edad promedio = $68,7 \pm 9,5$) y de dadores sanos ($n = 25$; edad promedio = $54,6 \pm 14,6$). No se detectaron diferencias significativas en la edad de los pacientes de ambos grupos (prueba de t de *student* no significativa). La cuantificación de los niveles de ARNs se obtuvo por *RNAseq* usando la plataforma GPL9052 *Illumina Genome Analyzer (Homo sapiens)*.

La abundancia diferencial de mRNAs, lncRNAs y miRNAs entre las vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer de próstata y dadores sanos fue calculada en *RStudio*, que utiliza el lenguaje de programación *R*; y se usaron los paquetes *DESeq2* (versión 1.34.0)¹⁴² y *edgeR* (versión 3.36.0)¹⁴³. Con la herramienta *DeepVenn* (<https://www.deepvenn.com/>)¹³³, se compararon ambas listas en busca de ARNs con abundancia diferencial identificados por ambos algoritmos de manera de aumentar la confianza de los resultados.

3.6.5. Predicción bioinformática de las funciones que podrían cumplir los miRNAs y lncRNAs transportados por las vesículas extracelulares de los tumores prostáticos en las células receptoras.

Para predecir la función de los miRNAs identificados, se analizaron las categorías de funciones y enfermedades más significativamente sobre-representadas según la plataforma TAM 2.0 (<http://www.lirmed.com/tam2/>; opción *overrepresentation*)¹³⁴.

Con la plataforma *miRNet 2.0* (<https://www.mirnet.ca/>; *degree cutoff* = 5)¹³⁵ se identificaron los lncRNAs y mRNAs blanco de los miRNAs candidatos seleccionados.

Los mRNAs blanco de regulación directa de los lncRNAs y miRNAs con abundancia diferencial en las vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer de próstata fueron determinados utilizando la plataforma ENCORI (<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)¹⁴⁰. Para obtener los blancos de los miRNAs se aplicaron los filtros de CLIP data ≥ 5 y program number = 3.

Con la plataforma DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)¹³⁶ se analizaron las categorías de ontología génica y vías de KEGG significativamente representadas por mRNAs identificados ($p < 0,05$; resultados expresados como π -valor = $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) * [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$). Además, se analizaron redes de interacción proteína-proteína entre aquellas codificadas por los mRNAs diferencialmente abundantes en las vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer de próstata, o aquellos reportados como blancos de regulación de los lncRNAs o miRNAs identificados en dichas vesículas. Las redes de interacción fueron construidas con *stringApp* v2.0.1 y *Cytoscape* v3.9.1¹⁴⁴, aplicando los filtros *confidence score cutoff* = 0,50 y *tissue score* 3-5 en hueso.

3.6.6. Estudio de asociación entre sus niveles en el tejido tumoral prostático y la sobrevida libre de progresión (PFS) y modelado de un puntaje de riesgo de PFS.

Se descargaron los datos de *RNAseq* de tumores primarios de próstata ($n = 482$) y la información clínica de los pacientes del *Prostate Adenocarcinoma Project* de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA-PRAD, <http://cancergenome.nih.gov/>) utilizando la plataforma UCSC Xena¹⁴⁵ (<https://xena.ucsc.edu/>, último acceso

en junio de 2021). En la **tabla 1** se presentan las características de los pacientes de TCGA-PRAD que se analizaron.

Tabla 1. Características de los pacientes del set de datos de TCGA-PRAD al momento del diagnóstico.

Características clínico-patológicas		Frecuencia n = 482
Edad	Promedio $\pm$ SD (años)	60,96 $\pm$ 6,82
	< 50 años	5,60%
	50-59 años	35,48%
	60-69 años	48,75%
	70-79 años	10,17%
Categoría ISUP	1	9,34%
	2	29,88%
	3	20,12%
	4	12,86%
	5	27,80%
PSA	< 4 ng/ml	11,00%
	4-10 ng/ml	57,05%
	> 10 ng/ml	31,33%
	ND	0,62%
Estadío T patológico	T2	38,59%
	T3	57,88%
	T4	2,07%
	ND	1,45%
Progresión	NO	81,54%
	SI	18,46%
PFS	Promedio (años)	2,67

ND: No determinado; PFS: supervivencia libre de progresión.

El tiempo de supervivencia libre de progresión (PFS) fue definido como aquel comprendido entre el momento del diagnóstico y la fecha de aparición del primer nuevo evento tumoral, definido como: la progresión de la enfermedad, la recurrencia locorregional, la metástasis a distancia, un nuevo tumor primario o la muerte del paciente con tumor¹⁴⁶.

Se evaluaron en paralelo los genes correspondientes a los lncRNAs y a los mRNAs identificados en las vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer de próstata. Se dividió a los pacientes en dos grupos según la alta o baja expresión de cada gen de interés. Para determinar el punto de corte, se empleó la herramienta *Cutoff Finder*¹⁴⁷ que utiliza el método del *p* mínimo para encontrar el punto de corte óptimo para una variable continua. Se realizaron curvas de Kaplan-Meier (KM) para estudiar las asociaciones entre la expresión de los genes candidatos y la PFS, se aplicaron la prueba de log-rank y el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox uni y multivariados para estimar los *Hazard Ratios*. Los genes que en el análisis univariado mostraron una asociación significativa con la PFS fueron incluidos posteriormente en un análisis estadístico multivariado.

Con aquellos que conservaron la significancia estadística en el análisis multivariado para predecir la PFS, se modeló un puntaje ARNs de riesgo según la **fórmula 1**:

$$1: \text{puntaje ARNs de riesgo} = \sum_{i=1}^n \text{Coeficiente } gen_i \times \text{Expresión } gen_i$$

En donde la expresión del gen toma valores de 0=expresión asociada a bajo riesgo de PFS o 1=expresión asociada a alto riesgo de PFS. Los coeficientes fueron calculados mediante la regresión de riesgo proporcional de Cox multivariada.

Se determinó la capacidad de estos cálculos para estratificar a los pacientes y se realizaron análisis multivariados incluyendo los parámetros clínico-patológicos de grupo ISUP, niveles de PSA al diagnóstico y estadio T patológico. Para esto se modeló, con los parámetros significativos en el modelo multivariado, un puntaje ARN+clínico de riesgo según la **fórmula 2**:

$$2: \text{puntaje ARN} + \text{clínico de riesgo} = \text{coeficiente puntaje ARN} \times \text{puntaje ARN} + \text{coeficiente ISUP} \times \text{ISUP}$$

En donde el puntaje ARN toma valores de 0= bajo puntaje o 1=alto puntaje; y el ISUP toma valores de 1 a 5 según el grupo ISUP al que pertenece el paciente. Los coeficientes fueron calculados mediante la regresión de riesgo proporcional de Cox multivariada.

Finalmente, se realizó un modelo estadístico predictivo de PFS incluyendo la expresión de todos los lncRNAs y mRNAs seleccionados y el grupo ISUP según la **fórmula 3**:

$$3: \text{puntaje lncRNA} + \text{puntaje mRNA} + \text{grupo ISUP} = \text{coeficiente puntaje lncRNA} \times \text{puntaje lncRNA} + \\ + \text{coeficiente puntaje mRNA} \times \text{puntaje mRNA} + \\ + \text{coeficiente ISUP} \times \text{ISUP}$$

Se graficaron curvas ROC¹⁴⁸ para los modelos que contemplaban a cada puntaje y al ISUP, por separado y de manera conjunta, y se compararon las áreas bajo las curvas (AUC).

Como validación de la utilidad del modelo final, se evaluó la capacidad del mismo para predecir el riesgo de progresión del cáncer de próstata con el paquete de R *asuri* (*Analysis of Survival and Patients Risk Prediction based on Gene Signatures*, versión 1.0, publicación en preparación) desarrollado por el Grupo de Investigación en Bioinformática y Genómica Funcional del Centro de Investigación del Cáncer (CiC-IBMCC), Universidad de Salamanca (USAL) y Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Salamanca, España. Esta herramienta permite realizar análisis de sobrevida y predicción de riesgo basándose en la implementación del modelo multivariante de regresión de riesgos proporcionales de Cox con penalización de norma L1, una regularización intermedia entre los modelos de regresión de Lasso y Ridge¹⁴⁹, cuya metodología es detallada por Bueno-Fortes *et al.*¹⁵⁰.

Los análisis se realizaron con el programa *RStudio* e involucraron también el uso de los paquetes *base* (versión 4.1.2), *dplyr* (versión 1.0.7), *survival* (versión 3.2-13), *survivalAnalysis* (versión 0.3.0), *ggplot2* (versión 3.3.5), *survminer* (versión 0.4.9) y *pROC* (versión 1.18.0), obtenidos de los repositorios *Bioconductor* y *Comprehensive R Archive Network (CRAN)*.

4. Resultados

4.1. *Análisis de la comunicación célula tumoral prostática - célula precursora ósea.*

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que el co-cultivo de células PC3 con un cultivo primario de osteoblastos inhibió la proliferación de los osteoblastos mediante una disminución de la expresión de las ciclinas A, B1 y D1, y a un aumento en la expresión de p21¹⁵¹. Además, el co-cultivo indujo también la expresión de *Runx2*, un factor de transcripción específico de osteoblastos, redujo la expresión de osteocalcina y, en consecuencia, disminuyó la formación de matriz ósea al compararlo con los osteoblastos en monocultivo¹⁵¹. También se demostró una reducción en la densidad de filopodios en las células PC3 cultivadas en el medio condicionado proveniente de un co-cultivo PC3:MC3T3 y, en consecuencia, se observó un menor contacto célula-célula¹⁵²; y que los co-cultivos célula tumoral prostática con células óseas modula la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo^{153,154}. Todos estos resultados demuestran que existe una comunicación intercelular entre las células prostáticas y las células óseas que es independiente del contacto célula-célula; sin embargo, no determinan si esta comunicación se produce por factores solubles que liberan las células, por vesículas extracelulares o por ambos mecanismos. Por ello, en esta tesis se propuso estudiar las ELVs liberadas por las células tumorales prostáticas y cómo estas modifican el fenotipo de las células óseas receptoras.

Para determinar si la comunicación entre las células PC3 y las células MC3T3 y Raw264.7 está mediada por vesículas extracelulares, se realizó un ensayo de marcación con CFSE y observación por microscopía de fluorescencia. Para ello, se marcaron las células tumorales prostáticas PC3 con CFDA-SE (CFSE diacetato), el cual puede atravesar la membrana plasmática y, una vez en el citoplasma, es hidrolizado por esterasas intracelulares generando CFSE (fluorescente) que es capaz de unirse covalentemente a proteínas intracelulares y mantener la fluorescencia por varios días y divisiones celulares. Luego de la marcación y lavado del CFDA-SE remanente, se realizó un co-cultivo indirecto entre PC3-CFSE y MC3T3 o Raw264.7 sin marcar. Después de 48 h de co-cultivo, las células MC3T3 o Raw264.7, originalmente sin marcar, se fijaron y se analizaron por microscopía confocal de fluorescencia en busca de marca de CFSE (**figura 19**). Se observó que hubo un pasaje de fluorescencia desde las células PC3-CFSE a las células MC3T3 y Raw264.7 inicialmente no marcadas (**figura 23**). Esto sugiere la existencia de un intercambio de biomoléculas desde las células tumorales prostáticas hacia las células precursoras óseas que, al menos en parte, podría estar dándose a través de vesículas extracelulares.

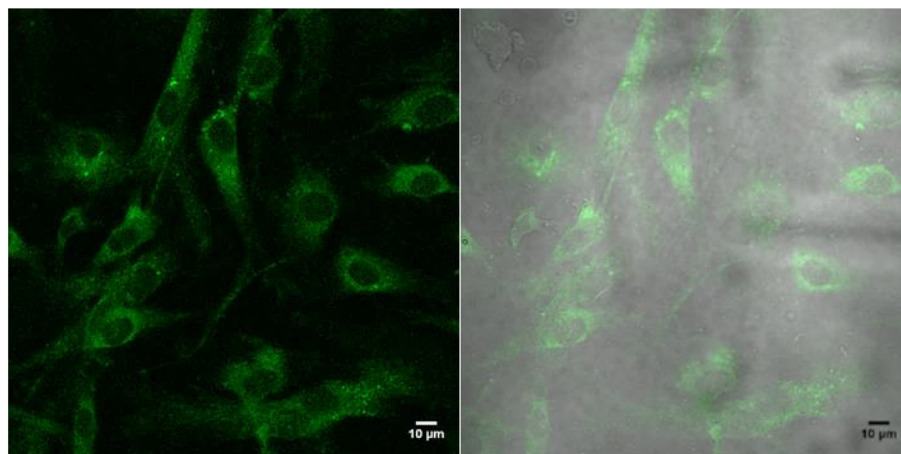
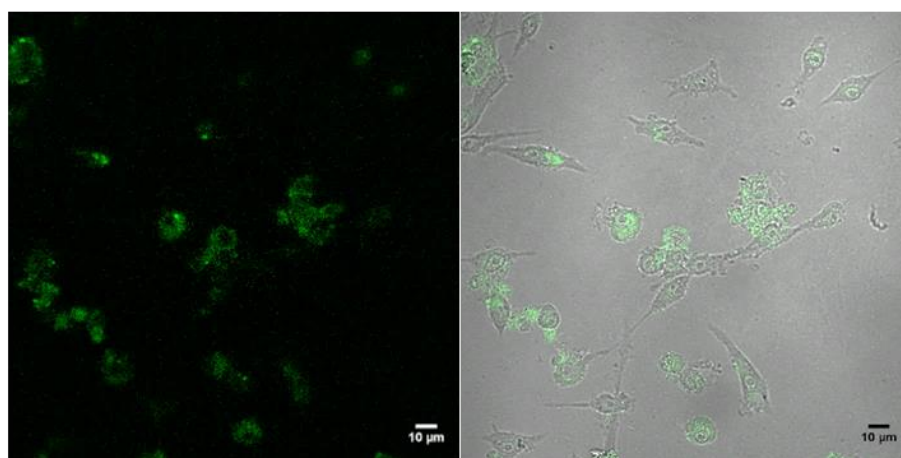
A MC3T3 co-cultivadas con PC3-CFSE**B Raw264.7 co-cultivadas con PC3-CFSE**

Figura 23. Estudio de la comunicación intercelular entre PC3-CFSE y MC3T3 o Raw264.7.

Fotografías de la microscopía de fluorescencia (paneles izquierdos) y contraste de interferencia diferencial (paneles derechos) de las células MC3T3 (A) y Raw264.7 (B) luego de 48 h de co-cultivo con PC3-CFSE. En ambos casos se muestra un campo representativo en el que se puede observar que las células MC3T3 y Raw264.7, originalmente no marcadas, adquirieron marcación de CFSE.

Aumento 60X, escala 10 µm.

4.2. Aislamiento y caracterización de ELVs derivadas de células PC3.

Se cultivaron las células PC3 en mono-cultivo con medio RPMI con 2% de SFB sin vesículas extracelulares. Luego de 48 h de cultivo, se recuperó el medio condicionado y se procedió a realizar el protocolo de centrifugaciones diferenciales utilizado para el aislamiento de ELVs (**figura 20**). El *pellet* obtenido luego del último paso de ultracentrifugación (enriquecido en ELVs) se analizó por diferentes métodos complementarios: citometría de flujo, Western Blot y microscopía electrónica de transmisión (**figura 24A-C**); con el objetivo de caracterizar morfológica y molecularmente a los elementos presentes en el *pellet*.

Por citometría de flujo, se pudo comprobar que las vesículas extracelulares aisladas tenían en sus membranas CD63 (capturadas por las esferas magnéticas con anti-CD63) y CD81 (detectada por el anticuerpo anti-CD81-PE) (**figura 21**). Este resultado es compatible con ELVs, ya que CD63 y CD81 son dos proteínas de membrana características, aunque no específicas, de ELVs (**figura 24A**). Por Western Blot se analizó la presencia de las

proteínas exosomales CD81, TSG101 y flotilina-1; observándose un enriquecimiento de las tres proteínas en el *pellet* respecto del extracto proteico total de las células PC3 (**figura 24B**). Por último, se realizó una observación morfológica por microscopía electrónica de transmisión contrastando con acetato de uranilo; pudiéndose visualizar y confirmar que las vesículas obtenidas tenían un diámetro de ~60-100 nm (**figura 24C**), compatible con el rango de tamaño esperado para las ELVs. En conjunto, todos estos resultados permitieron caracterizar al *pellet* obtenido luego de la ultracentrifugación como ELVs de PC3.

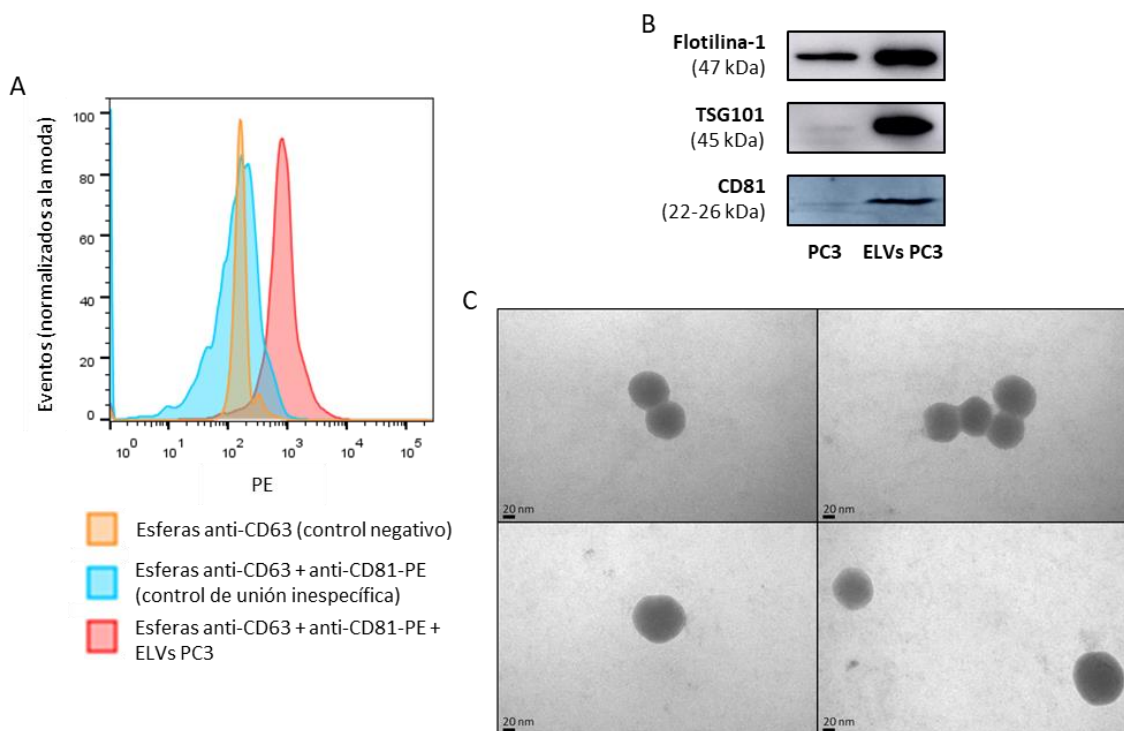


Figura 24. Caracterización molecular y morfológica de las vesículas extracelulares liberadas por las células PC3.

En la figura se muestra la caracterización molecular de las vesículas extracelulares aisladas luego de la ultracentrifugación final por citometría de flujo (A) y Western Blot (B), y la caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión contrastando con acetato de uranilo (C). Tanto por citometría de flujo como por Western Blot se pudieron detectar proteínas características de ELVs (CD63, CD81, TSG101 y flotilina-1). Además, por microscopia se observaron elementos compatibles, por forma y tamaño, con ELVs. En conjunto estos resultados permiten concluir que los elementos presentes en el *pellet* son compatibles con ELVs.

Aumento en la microscopía: 250.000X, escala 20 μ m. ELVs PC3: ELVs derivadas de células PC3.

4.3. Estudio del efecto de la exposición a ELVs derivadas de PC3 en las células precursoras óseas MC3T3 y Raw264.7.

Habiendo aislado y caracterizado las ELVs liberadas por las células PC3, se decidió estudiar si la exposición a estas vesículas induce cambios morfológicos y/o moleculares en células pre-osteoblásticas MC3T3 y pre-osteoclasticas Raw264.7. Para ello se analizó la viabilidad celular, la morfología y la expresión génica global luego de 24 h de exposición a las ELVs de PC3.

4.3.1. Estudio de cambios en la viabilidad celular

Con el objetivo de evaluar si las ELVs de PC3 son responsables, al menos en parte, de preparar el nicho metastásico óseo mediante el transporte de biomoléculas contenidas en vesículas extracelulares, se cultivaron células precursoras óseas MC3T3 y Raw264.7 en presencia de ELVs derivadas de células PC3 durante 24 h y se estudiaron potenciales cambios en el fenotipo de las mismas (**figura 22**). No se observaron cambios significativos en la viabilidad celular luego de la exposición a las ELVs de PC3 ninguna de las dos líneas de progenitores óseos (**figura 25**).

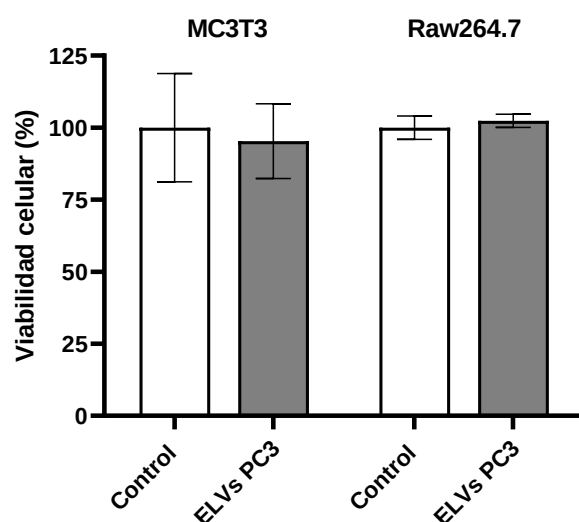


Figura 25. Efecto de las ELVs derivadas de PC3 sobre las células precursoras óseas.

Ensayo de viabilidad celular por MTS en células MC3T3 y Raw264.7 control o tratadas con ELVs de PC3 por 24 h. ELVs PC3: ELVs derivadas de células PC3.

4.3.2. Estudio de cambios morfológicos

Para estudiar el efecto de las ELVs sobre la morfología de las células MC3T3 y Raw264.7, luego de 24 h de tratamiento con las ELVs, las células fueron fijadas y marcadas con DAPI (núcleos) y faloidina-TRITC (filamentos de actina) para estudiar alteraciones en su morfología por microscopía confocal de fluorescencia. En las células MC3T3 no se detectaron cambios morfológicos después del cultivo con las ELVs de PC3 (**figura 26A**). Por el contrario, en las células Raw264.7 se observaron células más fusiformes con múltiples prolongaciones (**figura 26B**). Dos parámetros muy utilizados para cuantificar características morfológicas de las células son la circularidad —cuyo valor igual a 1 denota un círculo perfecto y al ir aproximándose a 0 señala una forma más alargada—, y el diámetro de Feret —que indica la distancia máxima entre dos puntos del área celular—. Luego de la exposición a las ELVs, las células Raw264.7 presentaron una disminución significativa en la circularidad (**figura 26C**) y un aumento significativo en el diámetro de Feret (**figura 26D**), confirmando ambos parámetros que las ELVs derivadas de PC3 estarían induciendo una morfología más fusiforme. Estos parámetros no pudieron determinarse en las células MC3T3 ya que, aún a bajos niveles de confluencia, crecen formando un entramado celular muy denso y resulta muy complejo poder determinar los límites de cada célula.

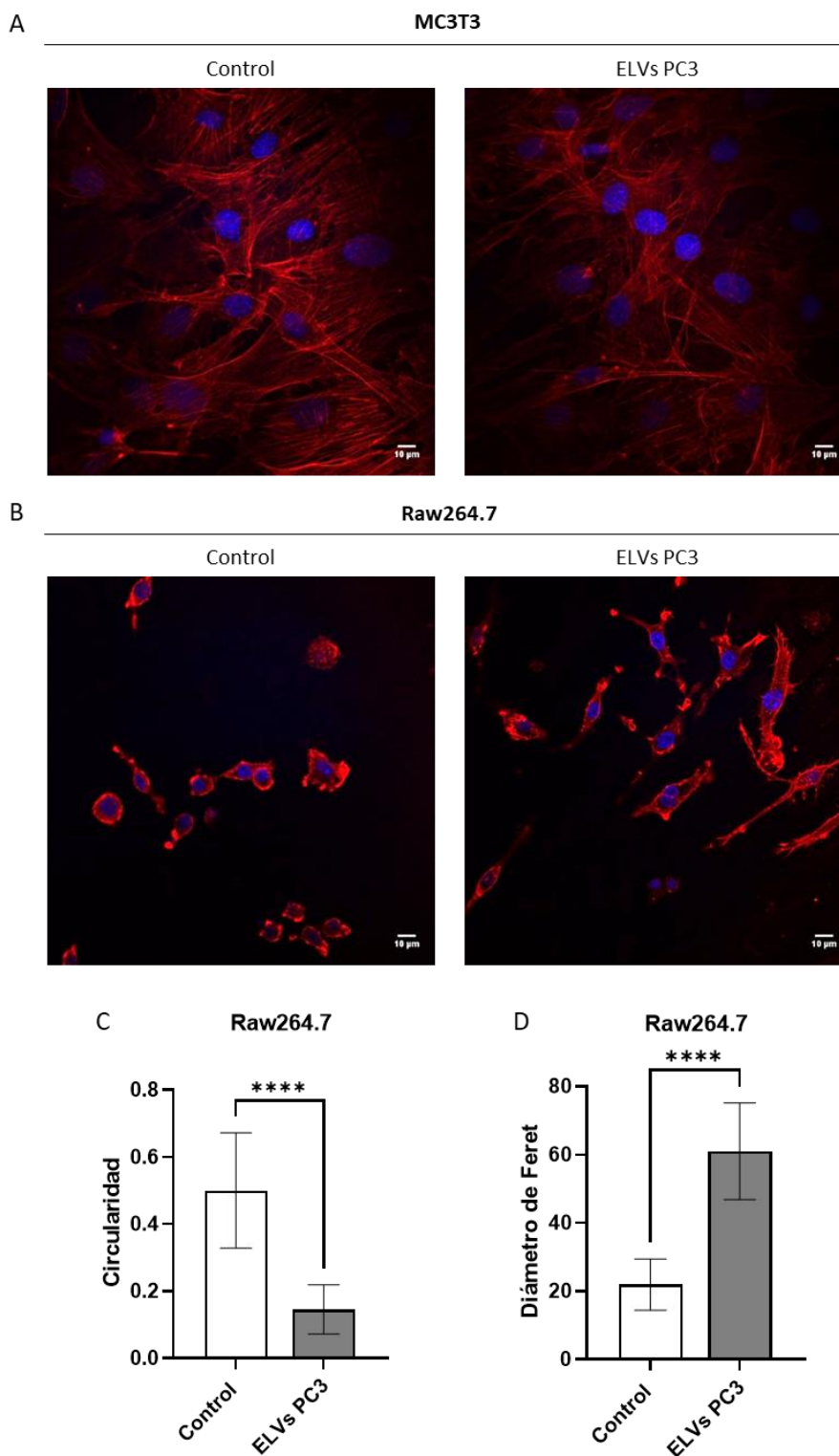


Figura 26. Efecto de la exposición de las células precursoras óseas a ELVs derivadas de PC3.

En la figura se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia de células MC3T3 (A) y Raw264.7 (B) control o tratadas con ELVs de PC3 por 24 h, fijadas y marcadas con DAPI (azul) y faloidina- TRITC (rojo). Aumento 60X, escala 10 µm. También se muestra la cuantificación de la circularidad (C) y el diámetro de Feret (D) calculados a partir del análisis de al menos 35 células Raw264.7.

ELVs PC3: ELVs derivadas de células PC3.

4.3.3. Estudio de cambios de expresión génica

Para evaluar si las ELVs de PC3 inducen cambios transcriptómicos en las células receptoras, se purificó ARN total de MC3T3 y Raw164.7 post-exposición a ELVs y cultivos control sin exposición, y se hibridaron en *microarrays* de expresión *Clariom™ S*. Los análisis de expresión génica diferencial entre las células expuestas a ELVs vs células sin exposición detectó cambios significativos de expresión en 276 genes en MC3T3 (**figura 27**). El mismo tratamiento indujo cambios de expresión en 280 genes en Raw264.7 (**figura 27**).

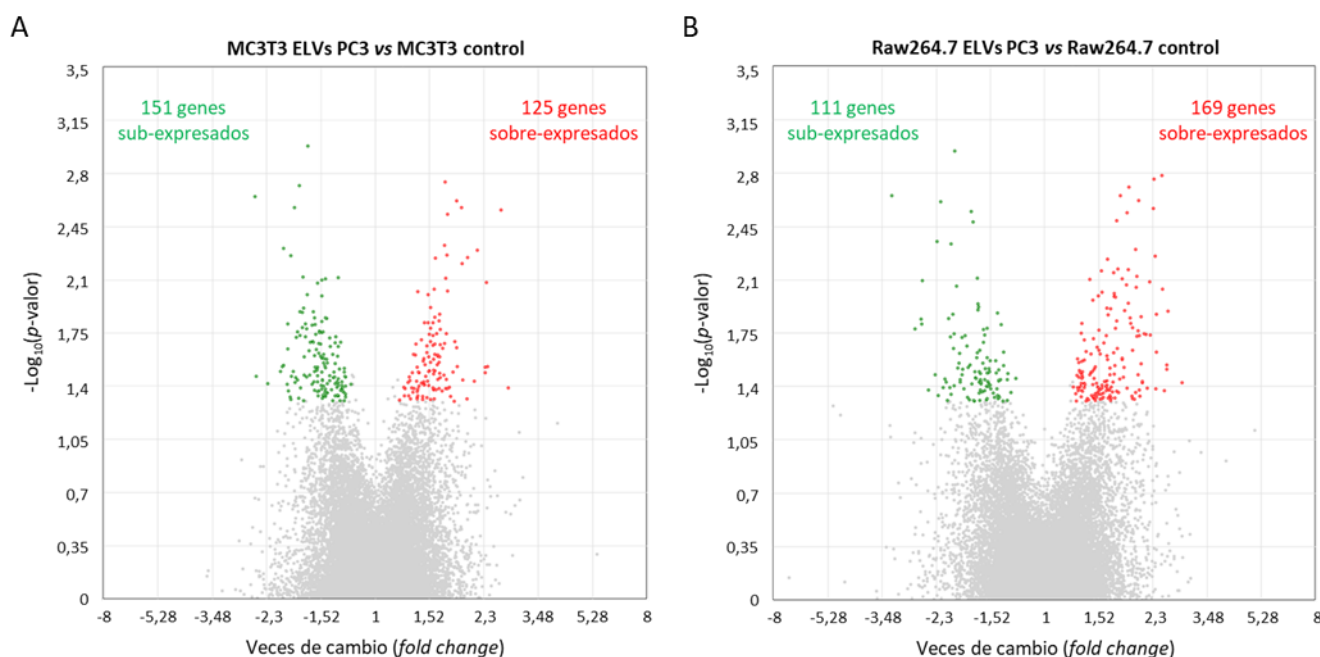
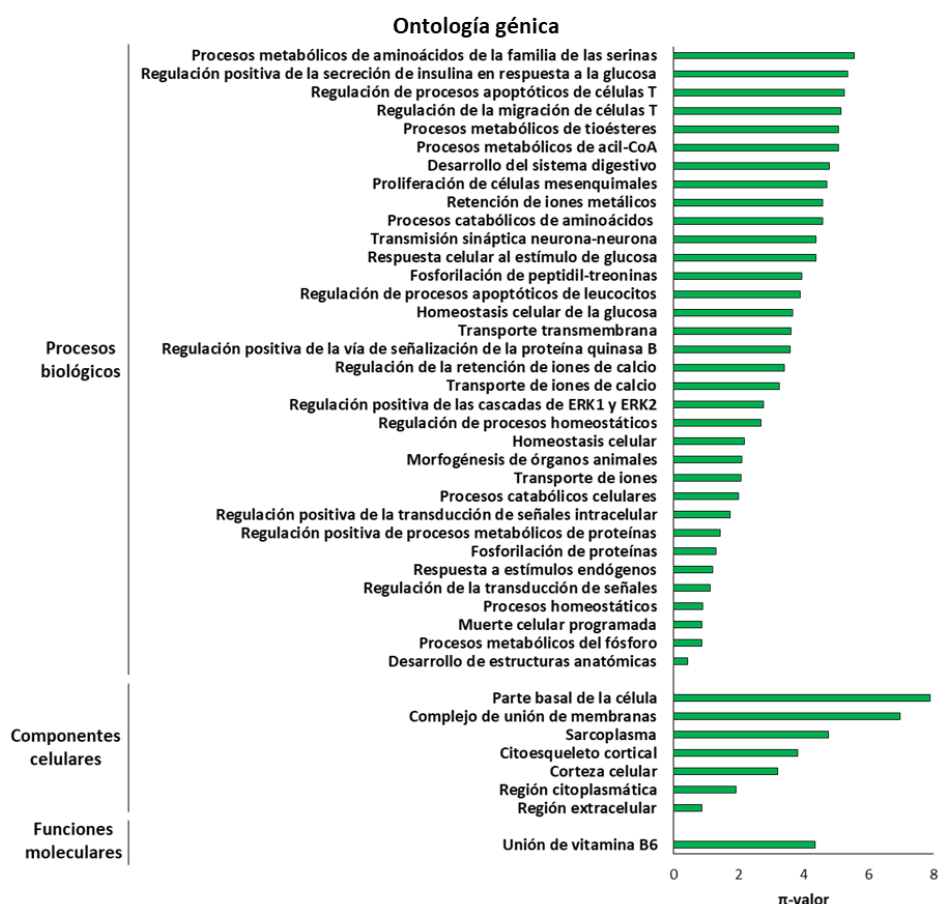


Figura 27. La exposición a ELVs de PC3 induce cambios transcriptómicos en las células receptoras.

En la figura se muestran los diagramas de volcán que permiten visualizar los cambios de expresión génica en las células MC3T3 (A) y Raw264.7 (B) expuestas a las ELVs de PC3 *versus* las mismas células no expuestas. Se consideró un cambio significativo si $|\text{veces de cambio}| > 1,2$ y $p < 0,05$. En verde se muestran los genes con menor expresión significativa en las células expuestas a las ELVs, y en rojo los que se expresan significativamente más en la misma condición.

Posteriormente, se analizó la ontología génica de los genes con expresión diferencial. Los resultados obtenidos con la herramienta DAVID se muestran en las **figuras 28 y 29**. En las células MC3T3, las ELVs reducen la expresión de genes relacionados con respuesta a la glucosa, proliferación de células mesenquimales, transporte y retención de calcio, metabolismo del fósforo, unión de vitamina B6 y metabolismo de aminoácidos y proteínas, entre otras (**figura 28**). Además, inducen la expresión de genes pertenecientes a categorías relacionadas con secreción y transporte de catecolaminas, adhesión, percepción de estímulos y señalización mediada por receptores de membrana (**figura 28**). En las células Raw264.7, las ELVs disminuyen la expresión de genes asociados a la regulación de la gametogénesis, la reproducción, la expresión génica, el metabolismo y la vía de señalización de los receptores Toll-like (**figura 29**); mientras que los genes que aumentan su expresión están asociados a categorías relacionadas con transporte, señalización y metabolismo del calcio, producción de citoquinas, adhesión celular, regulación de la señalización por BMPs, transporte transmembrana, percepción de estímulos mecánicos, transducción de señales, vesículas fagocíticas y secretorias y unión a receptores de quemoquinas CCR y de citoquinas, entre otras (**figura 29**).

MC3T3 ELVs PC3 vs MC3T3 control - Genes sub-expresados



MC3T3 ELVs PC3 vs MC3T3 control - Genes sobre-expresados

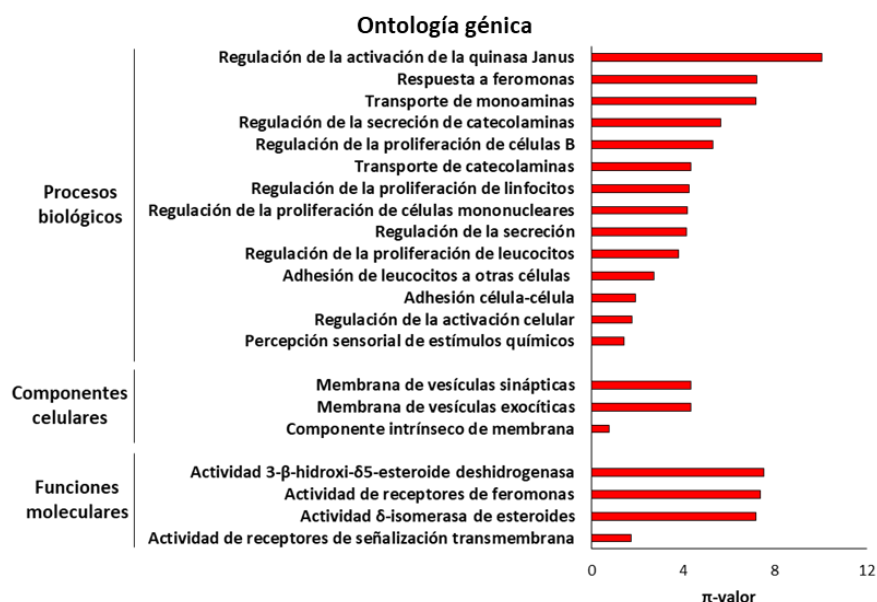


Figura 28. Análisis de ontología génica de los genes modulados en MC3T3 por la exposición a ELVs de PC3.

Se muestran las categorías significativamente representadas por los genes modulados en células MC3T3 expuestas a ELVs de PC3.

π -valor calculado como $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) * [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$.

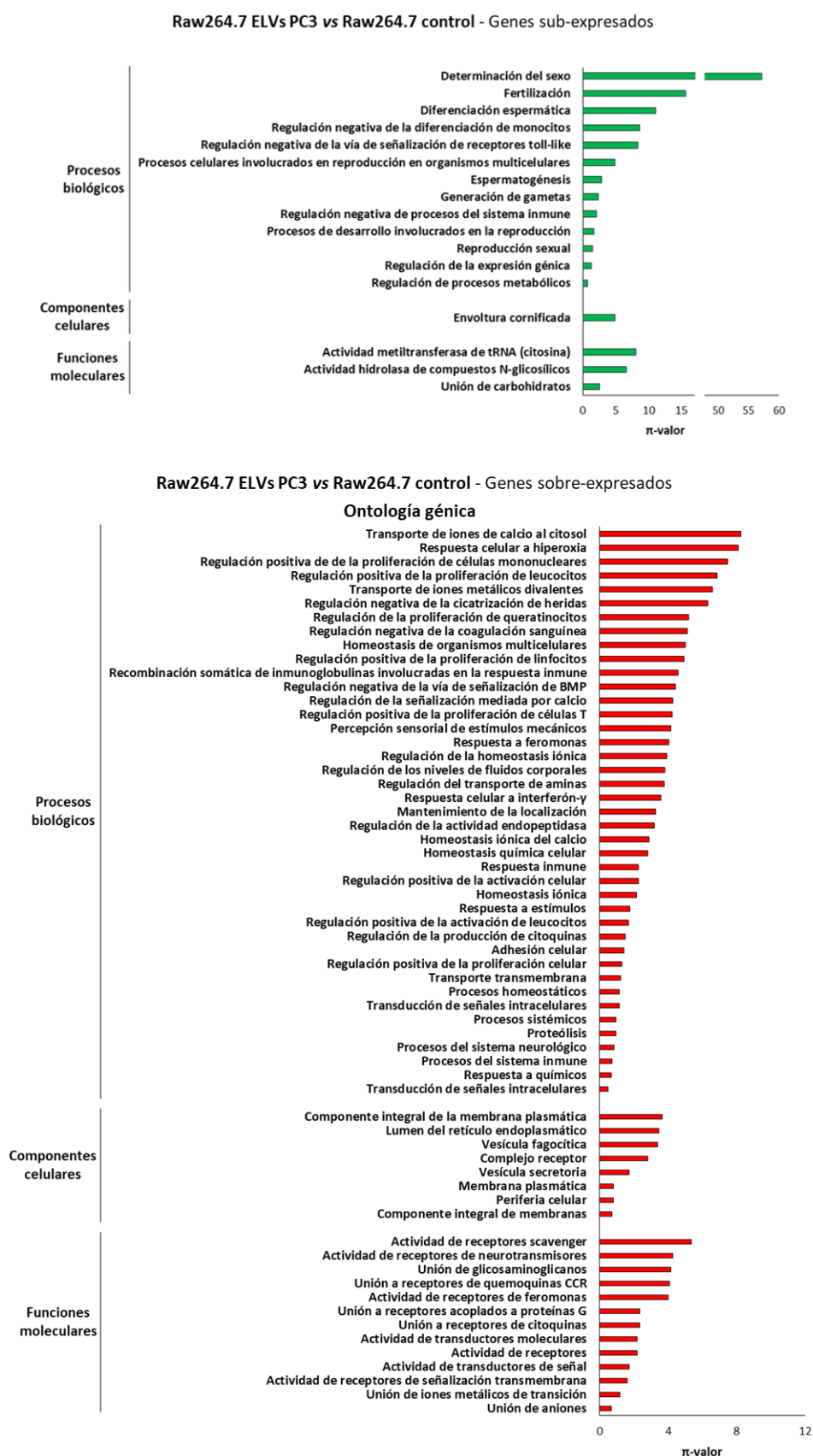


Figura 29. Análisis de ontología génica de los genes modulados en Raw264.7 por la exposición a ELVs de PC3.

Se muestran las categorías significativamente representadas por los genes modulados en células Raw264.7 expuestas a ELVs de PC3.

π-valor calculado como $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) * [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$.

4.4. Análisis bioinformático del contenido de miRNAs de las ELVs derivadas de células PC3 y predicción de la función que estos ejercerían en sus células receptoras.

Con el objetivo de identificar posibles responsables de los cambios observados en los puntos anteriores, se continuó estudiando el contenido de ARNs de las ELVs liberadas por las células PC3. Se realizó una búsqueda en el repositorio público GEO y se descargaron tres sets de datos de miRNAs presentes en ELVs de PC3 (GSE109356, GSE117744 y GSE35813). En cada uno de ellos se seleccionaron los 100 miRNAs más abundantes, se compararon las listas obtenidas, y se seleccionaron los 16 miRNAs comunes entre los tres subgrupos de datos (**figura 30**).

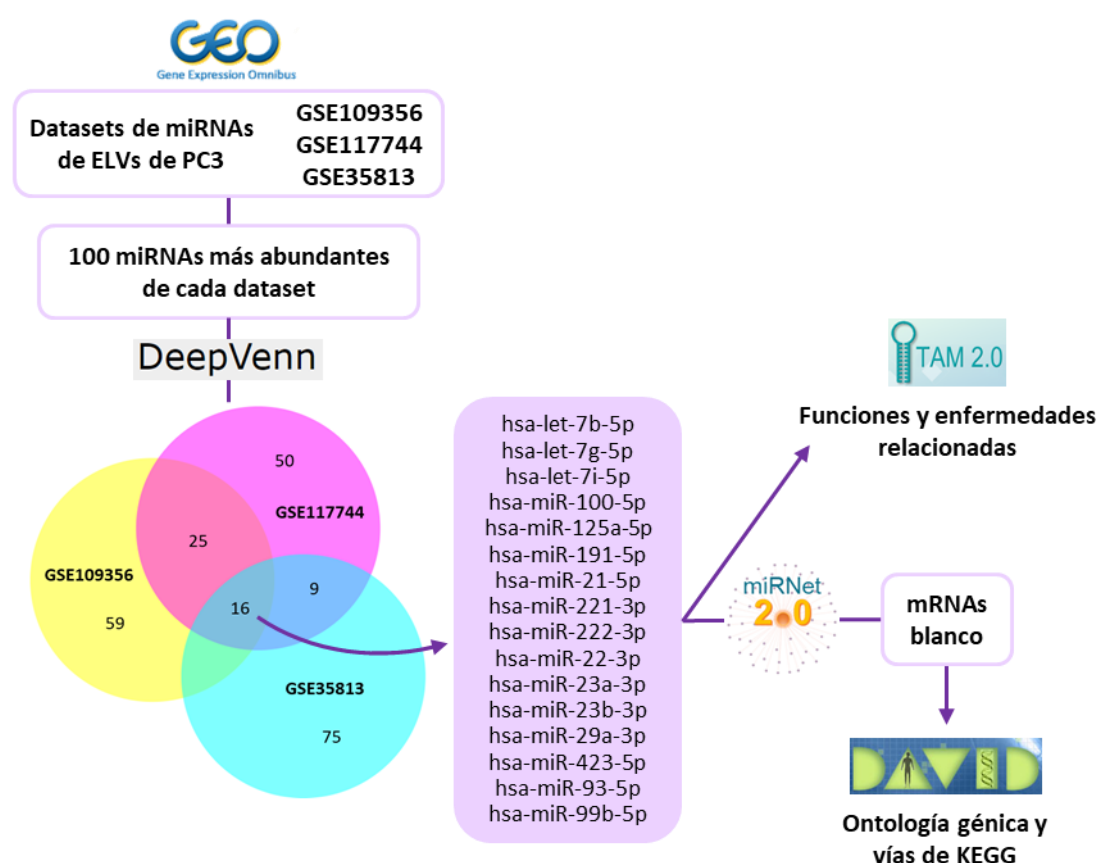


Figura 3. Flujo de trabajo para la exploración del contenido de miRNAs en las ELVs derivadas de células PC3 y predicción de su función en la célula receptora.

Esquema del análisis realizado a partir de datos públicos descargados de GEO y las plataformas utilizadas para el estudio posterior, TAM 2.0, miRNet 2.0 y DAVID v6.8.

Mediante la plataforma TAM 2.0, se analizaron las categorías correspondientes a funciones y enfermedades asociadas a los 16 miRNAs identificados. Entre las funciones, se destacan las categorías vinculadas con inflamación, regeneración ósea, transición epitelio-mesenquimal y angiogénesis (**figura 31A**). Y entre las enfermedades asociadas a estos miRNAs se describen distintos tipos de neoplasias, incluidas las prostáticas (**figura 31B**).

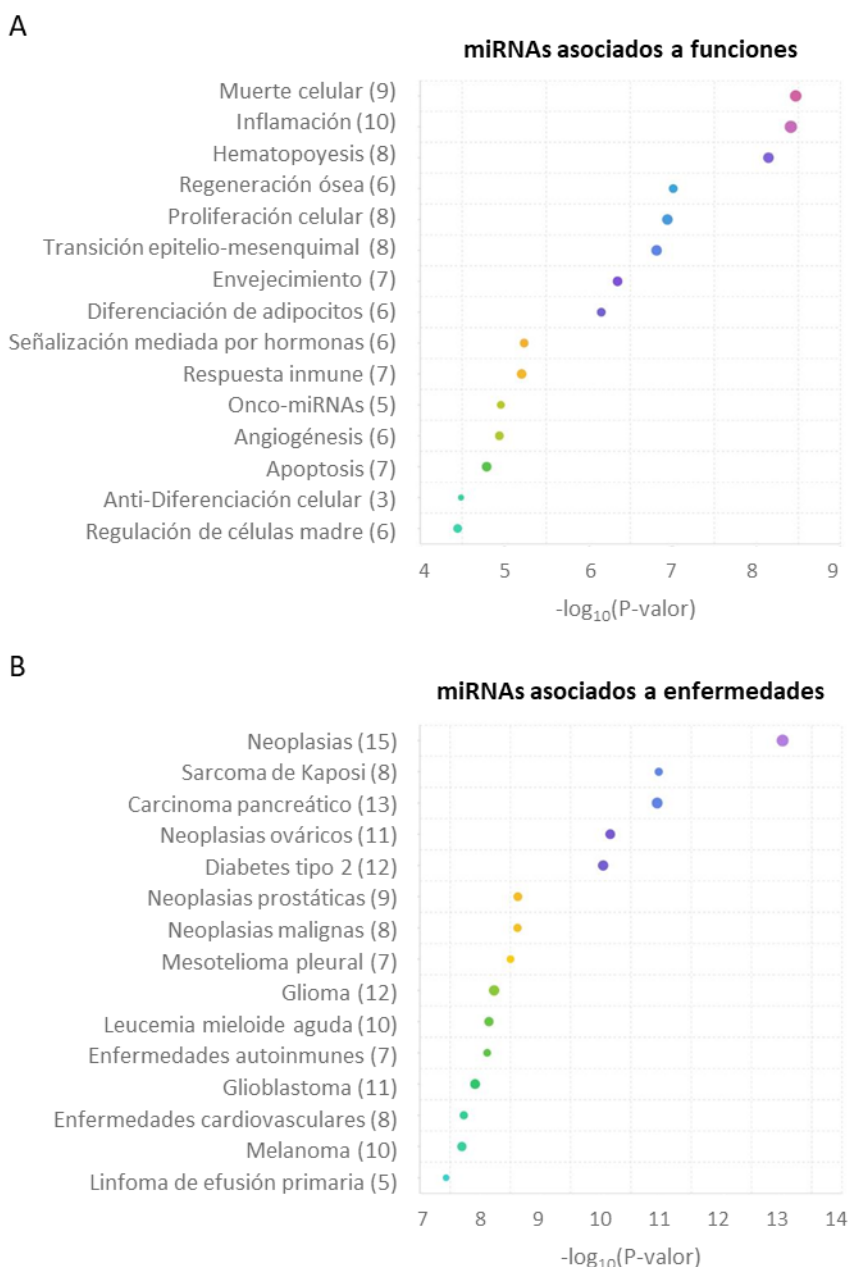


Figura 31. Análisis de las funciones y enfermedades asociadas a los miRNAs más abundantes en las ELVs derivadas de células PC3.

La figura muestra los resultados obtenidos por la herramienta TAM 2.0. En el panel A se muestran las categorías más significativamente representadas y relacionadas con distintas funciones celulares. En el panel B se muestran las enfermedades más significativamente asociadas a estos miRNAs.

Luego, utilizando la plataforma miRNet 2.0 y bajo la premisa que los miRNAs se unen a mRNAs y lncRNAs para modular su expresión y funciones, se identificaron los mRNAs y lncRNAs blanco de los 16 miRNAs identificados en las ELVs de PC3. Con esta herramienta se logró construir una posible red regulatoria que ejercerían estos miRNAs en las células receptoras (**figura 32A**). Con la plataforma DAVID v6.8, se analizaron las categorías de ontología génica más significativamente representadas por los mRNAs identificados como blanco de los miRNAs, entre las cuales se encontraron categorías relacionadas con tumorigénesis, adhesión celular, vías de señalización desreguladas en cáncer, exosomas y cáncer de próstata (**figura 32B-E**).

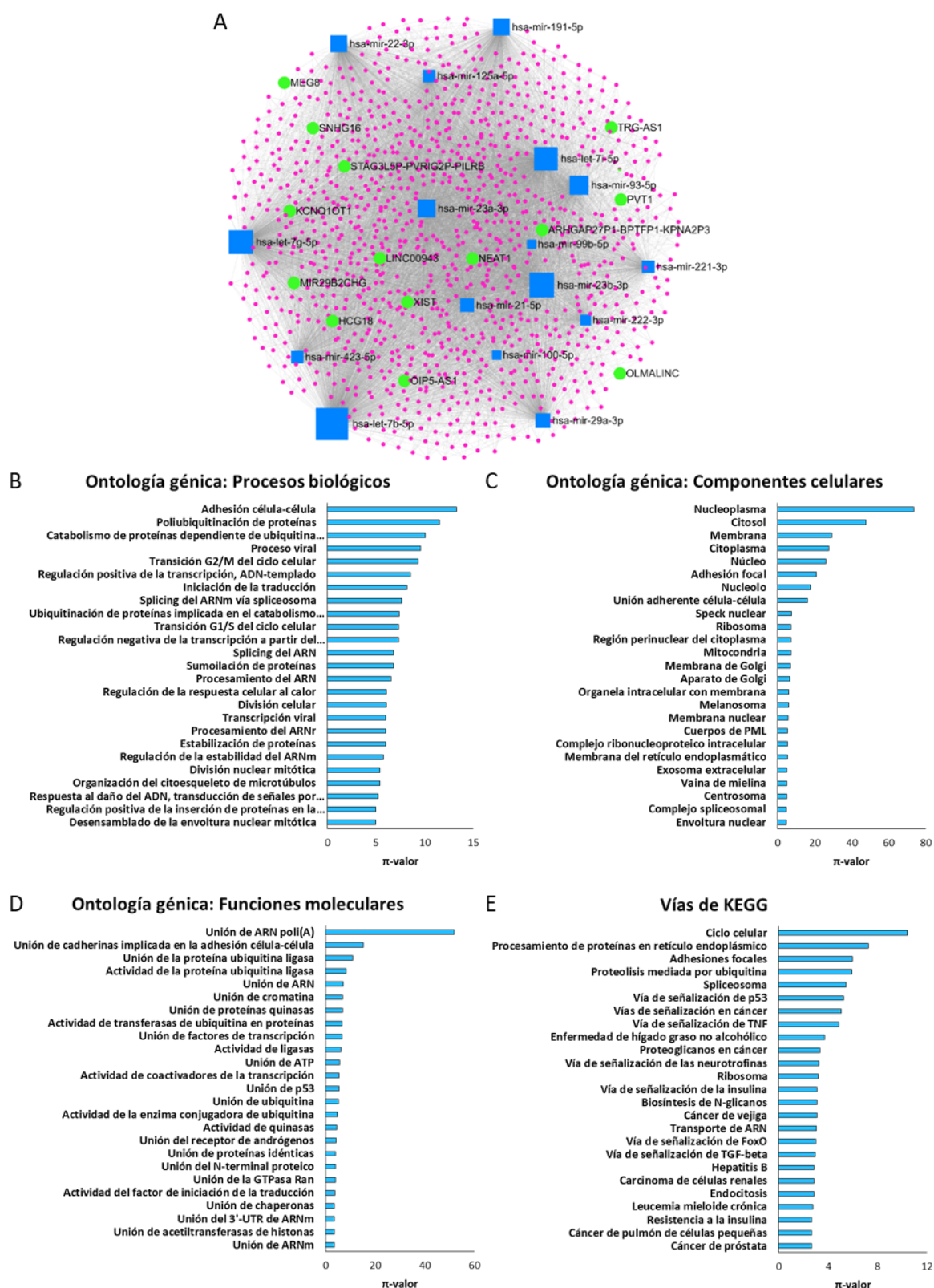


Figura 32. Predicción de las redes regulatorias y ontología génica de los mRNA y lncRNAs blanco de los 16 miRNAs más abundantes en las ELVs derivadas de PC3.

En el panel A se representa la compleja red de interacción entre los 16 miRNAs identificados (azul), lncRNAs (verde) y mRNAs (violeta). En los paneles B a E se muestran las categorías de ontología génica y vías de KEGG más significativamente representadas por los mRNA y lncRNA blanco de los 16 miRNAs.

π -valor calculado como $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) * [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$.

4.5. Estudio del contenido de ARNs no codificantes de las ELVs de PC3 mediante microarrays de expresión y de la regulación que ejercerían en sus células receptoras.

Considerando que los sets de datos utilizados anteriormente solo proveían información sobre el contenido de miRNAs en las ELVs de PC3, se decidió estudiar también el contenido de otros tipos de ARNs en dichas vesículas. Para ello, se aislaron ELVs de PC3 como fue descrito en Materiales y Métodos, se extrajo el ARN total y se hibridó en *microarrays* de expresión *Clariom™ D*. De esta manera, se detectaron 29.588 transcritos, distribuidos de la siguiente manera: 36,34% codificantes de proteínas; 25,47% pseudogenes; 10,98% ARNs no codificantes; y 27,21% correspondiente a otros o no asignados (**figura 33A**). Dado el potencial regulatorio de los ARNs no codificantes, se focalizó el estudio en este grupo, compuesto mayoritariamente por lncRNAs (41,43%) (**figura 33B**).

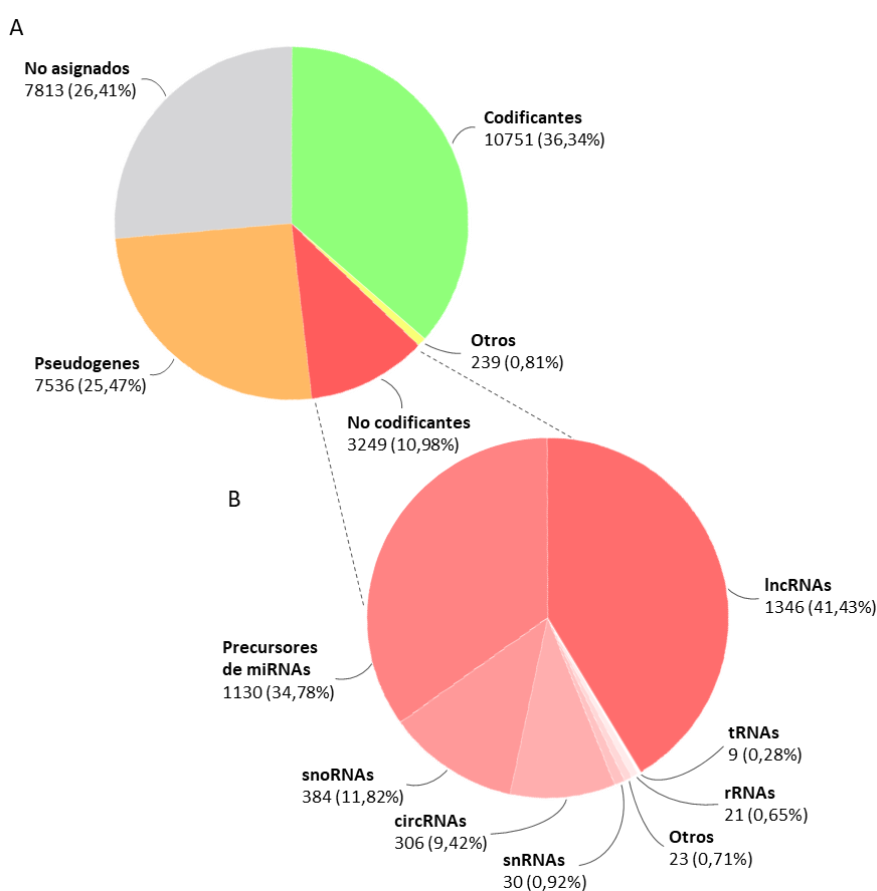


Figura 33. Contenido de ARNs de las ELVs derivadas de PC3.

Los gráficos muestran los distintos tipos de transcritos identificados mediante el *microarray* de expresión *Clariom™ D* a nivel global (A) y los subtipos dentro del grupo de ARNs no codificantes (B). Se indica la cantidad absoluta de transcritos y el porcentaje que representan.

circRNAs: ARNs circulares, rRNAs: ARNs ribosomales, snoRNAs: ARNs nucleolares pequeños, snRNAs: ARNs nucleares pequeños, tRNAs: ARNs de transferencia.

Se continuó el análisis con los lncRNAs más abundantes en las ELVs de PC3, bajo la premisa de que serían los que mayor efecto tendrían en las células receptoras; por lo que se seleccionaron como candidatos a 30/1.346, con abundancia mayor a $\geq 7,9$ (**figura 34**). Utilizando la herramienta ENCORI, se identificaron los mRNAs blanco de los lncRNAs seleccionados y con la plataforma DAVID se analizó la ontología génica de los mismos para determinar las vías y procesos que podrían estar regulando estos 30 lncRNAs en sus células receptoras. Entre las categorías más representadas se encuentran algunas vinculadas con modificaciones de la cromatina, regulación de la transcripción y la traducción, degradación del ARN, proteólisis, diferentes tipos de uniones intercelulares, adhesión, vías metabólicas, citoesqueleto cortical, interacciones SNARE en transporte vesicular y cáncer de próstata (**figura 35**).

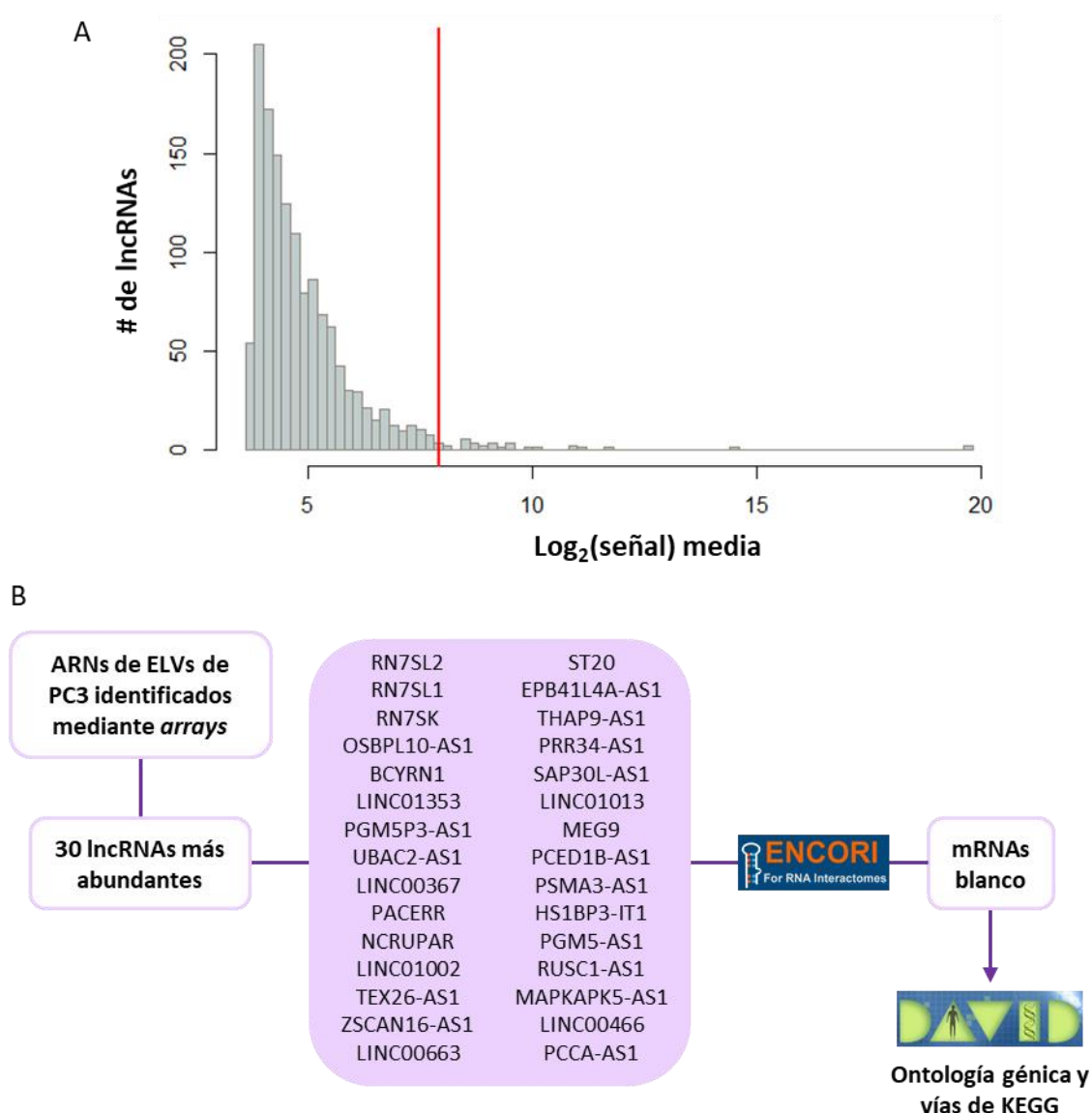


Figura 34. Exploración del contenido de lncRNAs de las ELVs derivadas de células PC3.

En el panel superior (A) se muestra el histograma con la distribución de abundancias de los 1.346 lncRNAs. Con la línea vertical roja se muestra el punto de corte utilizado para seleccionar a los lncRNAs candidatos para seguir con los análisis. En el panel inferior (B) se esquematiza el flujo de trabajo con el que se continuaron los análisis y la lista de los 30 lncRNAs seleccionados.

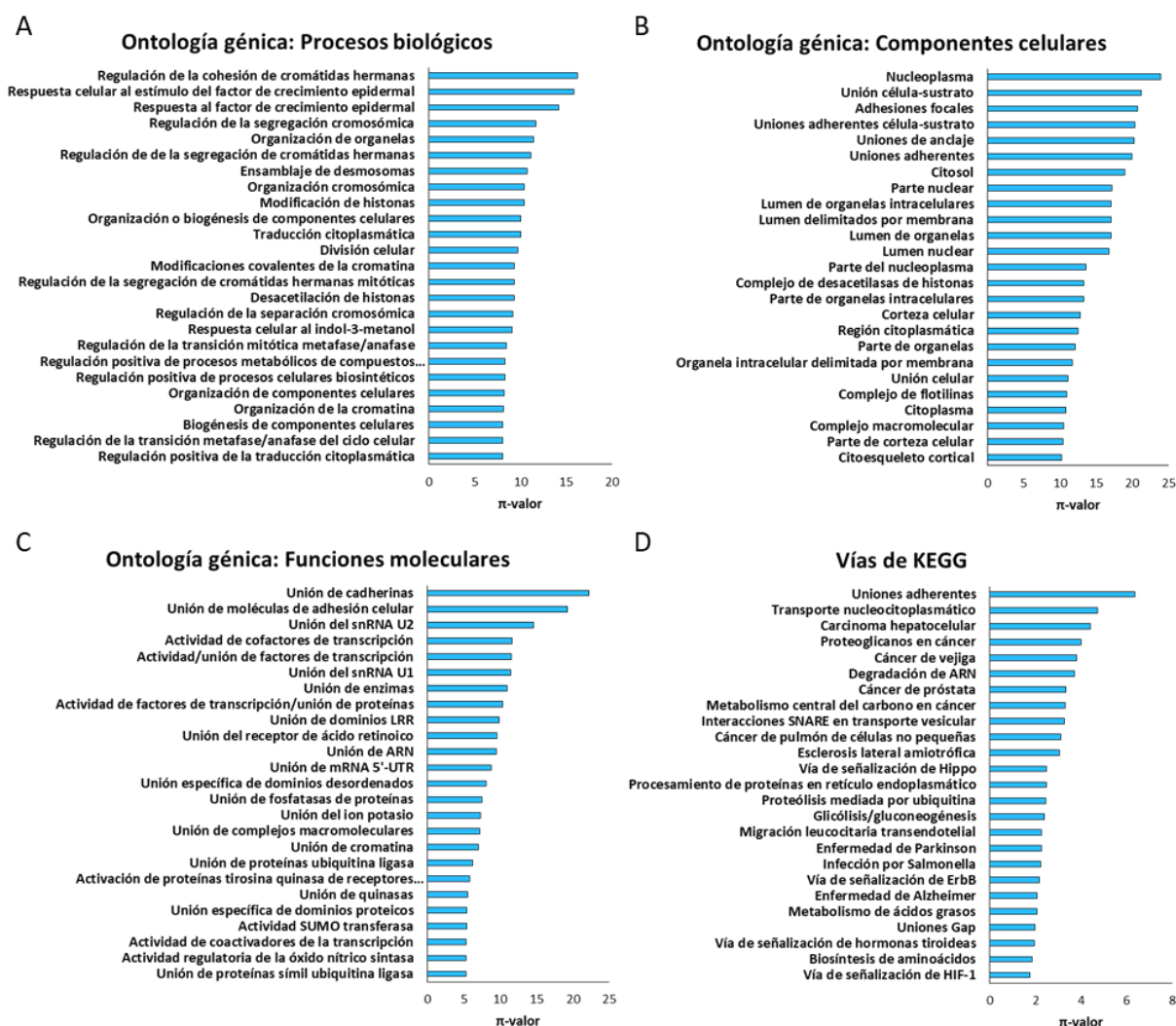


Figura 35. Análisis de ontología génica y vías de KEGG de los mRNA blancos de los lncRNAs más abundantes en las ELVs derivadas de PC3.

Los gráficos muestran las categorías de procesos biológicos (A), componentes celulares (B), funciones moleculares (C) y de vías de KEGG (D) más significativamente representadas por los mRNA blanco de los 30 lncRNAs seleccionados.

π -valor calculado como $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) * [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$.

4.6. Identificación de ARNs diferencialmente abundantes en vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de próstata y predicción de la red regulatoria que modularían en las células óseas.

Los resultados presentados hasta este punto fueron obtenidos a partir de ensayos *in vitro* utilizando ELVs provenientes de la línea celular tumoral prostática humana PC3. Para complementar estos estudios, y con el objetivo final de identificar biomarcadores de progresión tumoral, se realizó un estudio bioinformático utilizando muestras de tumores prostáticos humanos y vesículas extracelulares disponibles en repositorios públicos.

Se identificó un *set* de datos en el repositorio público GEO (GSE71008) que cuenta con datos de RNA-seq de vesículas extracelulares obtenidas a partir de plasma de pacientes con cáncer de próstata ($n = 36$) y de hombres sanos ($n = 25$). Es importante mencionar que los autores utilizaron el kit comercial *ExoQuick™ Exosome*

Precipitation Solution (System Biosciences, Palo Alto, California, EEUU) que permite la precipitación controlada de vesículas de entre 30 y 200 nm; por lo que, probablemente, los resultados puedan diferir de los presentados hasta aquí. Pero al no identificar estudios que analicen específicamente ELVs de pacientes con cáncer de próstata, se decidió continuar con el análisis. Para ello, se descargaron los datos de GEO y se analizó la abundancia diferencial entre los pacientes con cáncer de próstata y los dadores sanos. Se utilizaron dos algoritmos distintos (*DESeq2* y *edgeR*) para aumentar la confianza de los resultados. Se identificaron 64 (*DESeq2*) y 44 (*edgeR*) ARNs diferenciales, siendo 30 de ellos comunes a ambas listas de resultados (**figura 36**). En la tabla de la **figura 36** se listan los 30 ARNs con abundancia diferencial significativa, identificándose 6 lncRNAs, 9 miRNAs y 15 mRNAs.

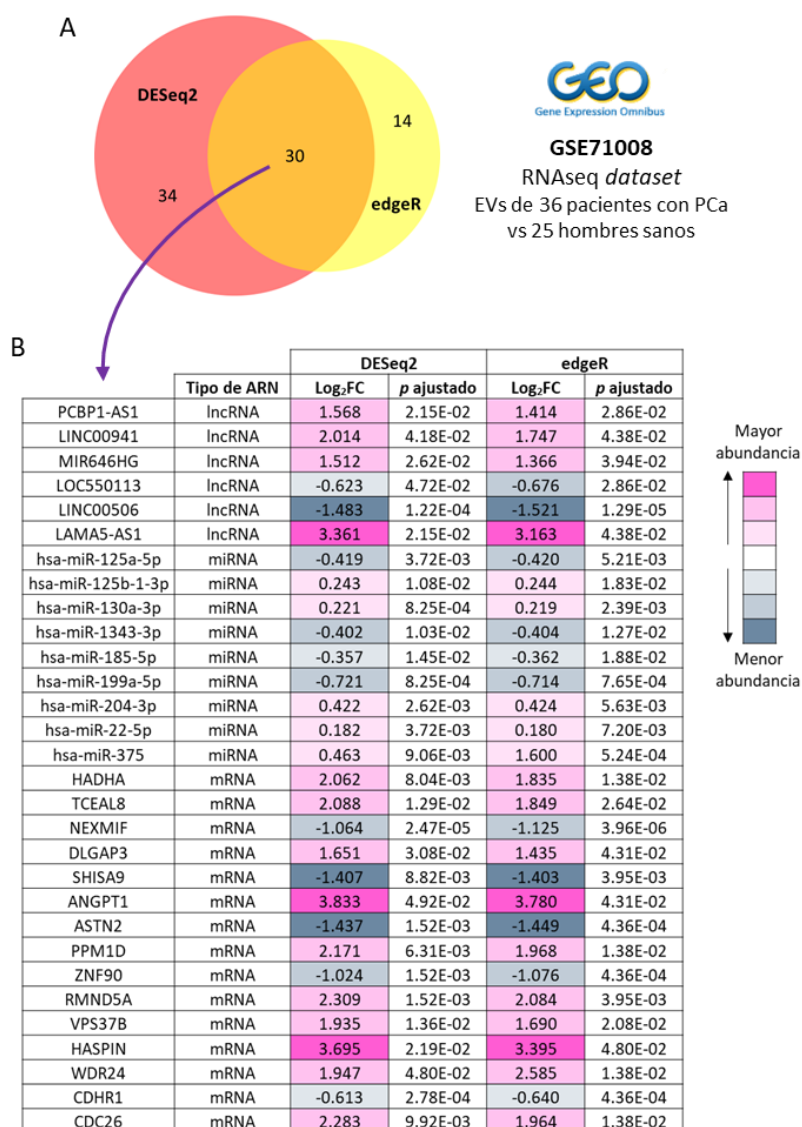


Figura 36. Análisis del contenido de ARNs en vesículas extracelulares (EVs) obtenidas a partir de plasma de pacientes con cáncer de próstata y hombres sanos.

Se utilizaron los datos de GSE71008 para identificar ARNs con abundancia diferencial en las vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de próstata. Se usaron *DESeq2* y *edgeR* como algoritmos. De la comparación de ambos resultados surgieron 30 ARNs candidatos para continuar con los estudios, que se listan en la tabla de la figura junto con las diferencias de abundancia y los valores *p* ajustados.

Para inferir las posibles funciones que podrían tener estos ARNs en las células óseas receptoras, se realizó un análisis *in silico* utilizando distintas bases de datos de acceso público según el flujo de trabajo que se muestra en la **figura 37**.

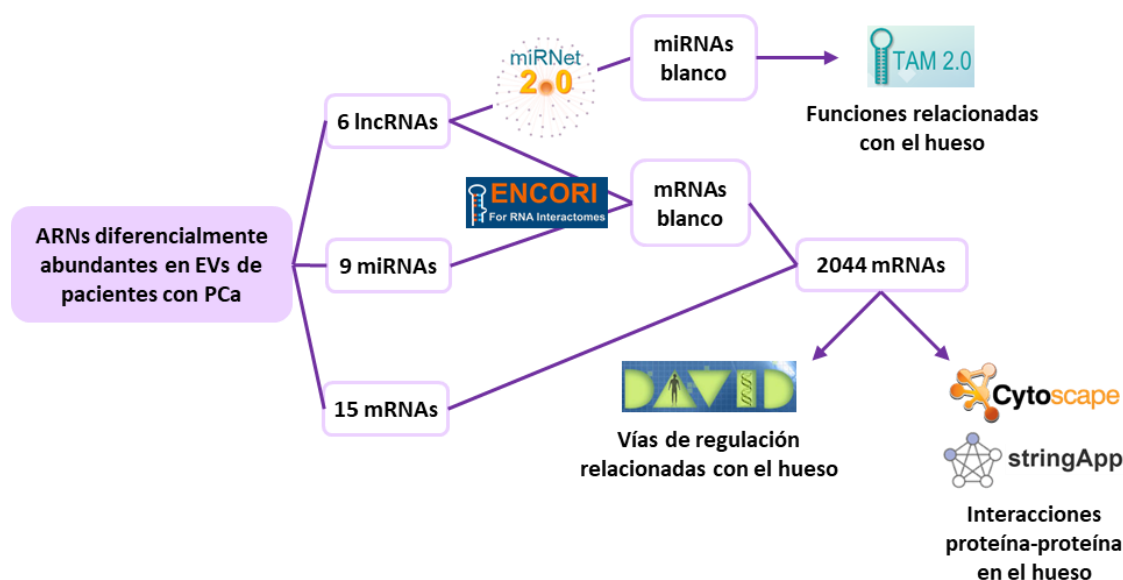


Figura 37. Flujo de trabajo para el análisis *in silico* de las posibles redes regulatorias que podrían cumplir los ARN con abundancia diferencial en vesículas extracelulares de pacientes con cáncer de próstata.

Se muestra el flujo de trabajo implementado para identificar los potenciales blancos de regulación de los 30 ARNs candidatos, así como también sus funciones, vías de señalización asociadas y las interacciones entre las proteínas que estos codifican en el contexto del tejido óseo.

Considerando que una de las funciones descritas de los lncRNAs es actuar como “esponjas” de miRNAs, se buscaron en miRNet 2.0 los miRNAs reportados como blancos de los 6 lncRNAs identificados; de los cuales solo 4 se encontraban en esta base de datos: *PCBP1-AS1*, *LINC00941*, *MIR646HG* y *LINC00506*. Los resultados permitieron identificar 80 miRNAs con capacidad de unión a estos 4 lncRNAs, formando una compleja red regulatoria (**figura 38A**). A continuación, utilizando la plataforma TAM 2.0, se analizaron las funciones asociadas a estos 80 miRNAs. Entre las funciones significativamente representadas ($p < 0,05$) se encontraron varias relacionadas con la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos, la formación de colágeno, la remodelación de la matriz extracelular y la regulación de las vías de señalización de NF- κ B y WNT; todas ellas claves en el balance entre la formación y la resorción ósea (**figura 38B**).

Además, teniendo en cuenta que tanto los lncRNAs como los miRNAs pueden regular la estabilidad y la traducción de mRNAs por interacción directa, se amplió el estudio consultando la base de datos ENCORI para encontrar posibles mRNAs blanco de los 6 lncRNAs y 9 miRNAs identificados. En esta base de datos se encontraron registros para 3/6 lncRNAs (*PCBP1-AS1*, *LINC00941* y *MIR646HG*) y 6/9 miRNAs (*hsa-miR-125a-5p*, *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR-1343-3p*, *hsa-miR-185-5p*, *hsa-miR-199a-5p* y *hsa-miR-375*). Esta herramienta arrojó una lista de 2.029 mRNAs con capacidad de unión a los 3 lncRNAs y 6 miRNAs. Finalmente, se analizó la ontología génica, vías de Reactome y KEGG de 2.044 mRNAs (2.029 caracterizados por ENCORI y 15 con abundancia diferencial en las vesículas extracelulares de los pacientes) mediante la plataforma DAVID v6.8 (**figura 39A-C**).

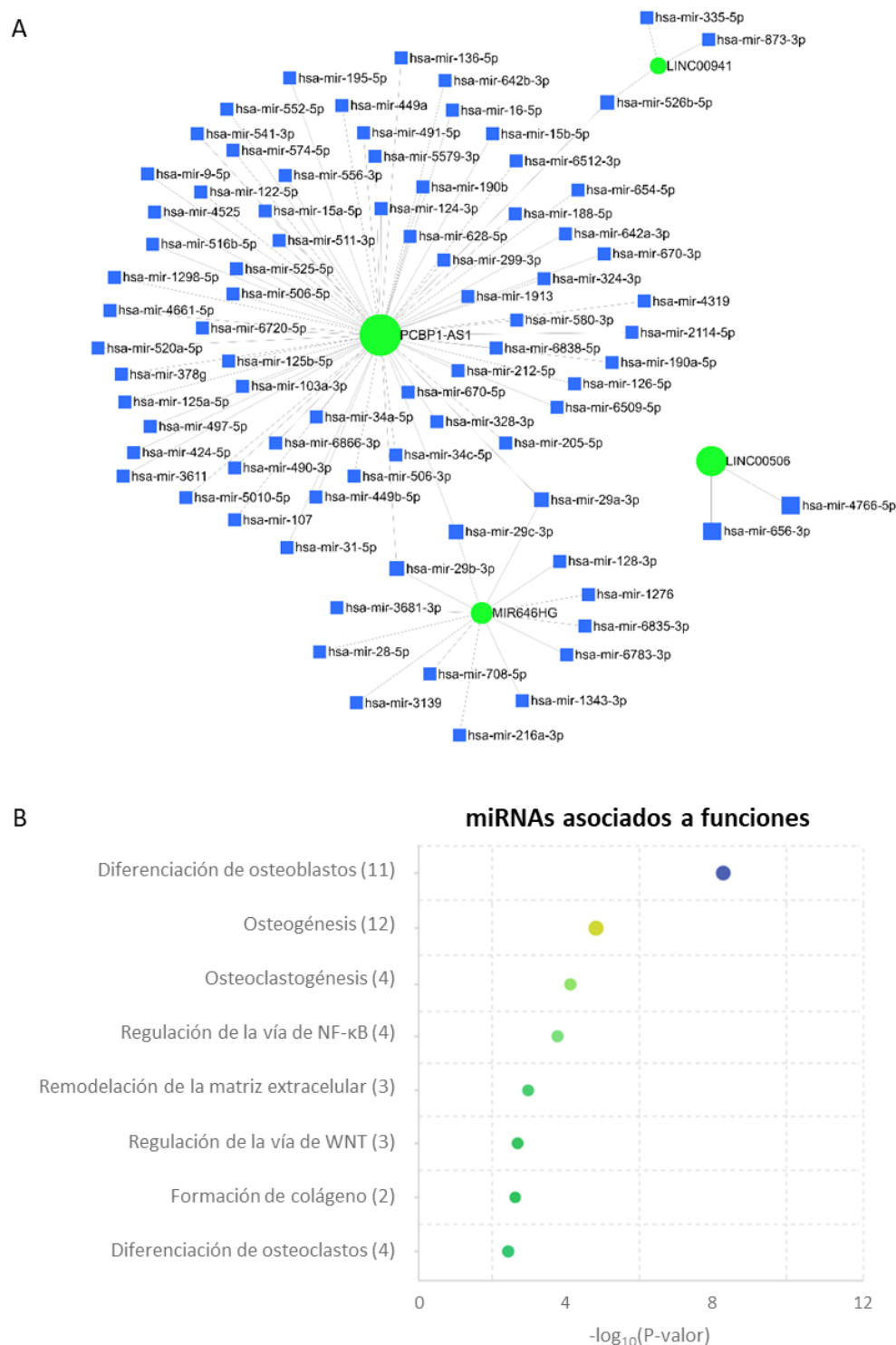


Figura 38. Identificación y caracterización de miRNAs con capacidad de unión a los lncRNAs diferencialmente abundantes en vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer de próstata.

En el panel A se muestra la compleja red de regulación que podría generarse entre 4/6 lncRNAs seleccionados y los 80 miRNAs identificados por miRNet 2.0. En el panel B se muestran las funciones asociadas a estos 80 miRNAs según la plataforma TAM 2.0. El número entre paréntesis muestra el número de miRNAs en cada categoría. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

Adicionalmente, utilizando la aplicación stringApp en Cytoscape, se construyó la red de interacciones proteína-proteína entre aquellas codificadas por los 2.044 mRNAs identificados. Dada la complejidad de la red obtenida, por la gran cantidad de proteínas involucradas, se aplicó un filtro de modo de seleccionar únicamente aquellas que presentan mayores niveles de expresión en hueso; entre las cuales se encontraron fibronectina, anexina A2, RUNX2, CSF1, NF- κ B P65 (también denominada RELA), periostina y diferentes tipos de colágeno, integrinas y factores de crecimiento (**figura 39D**).

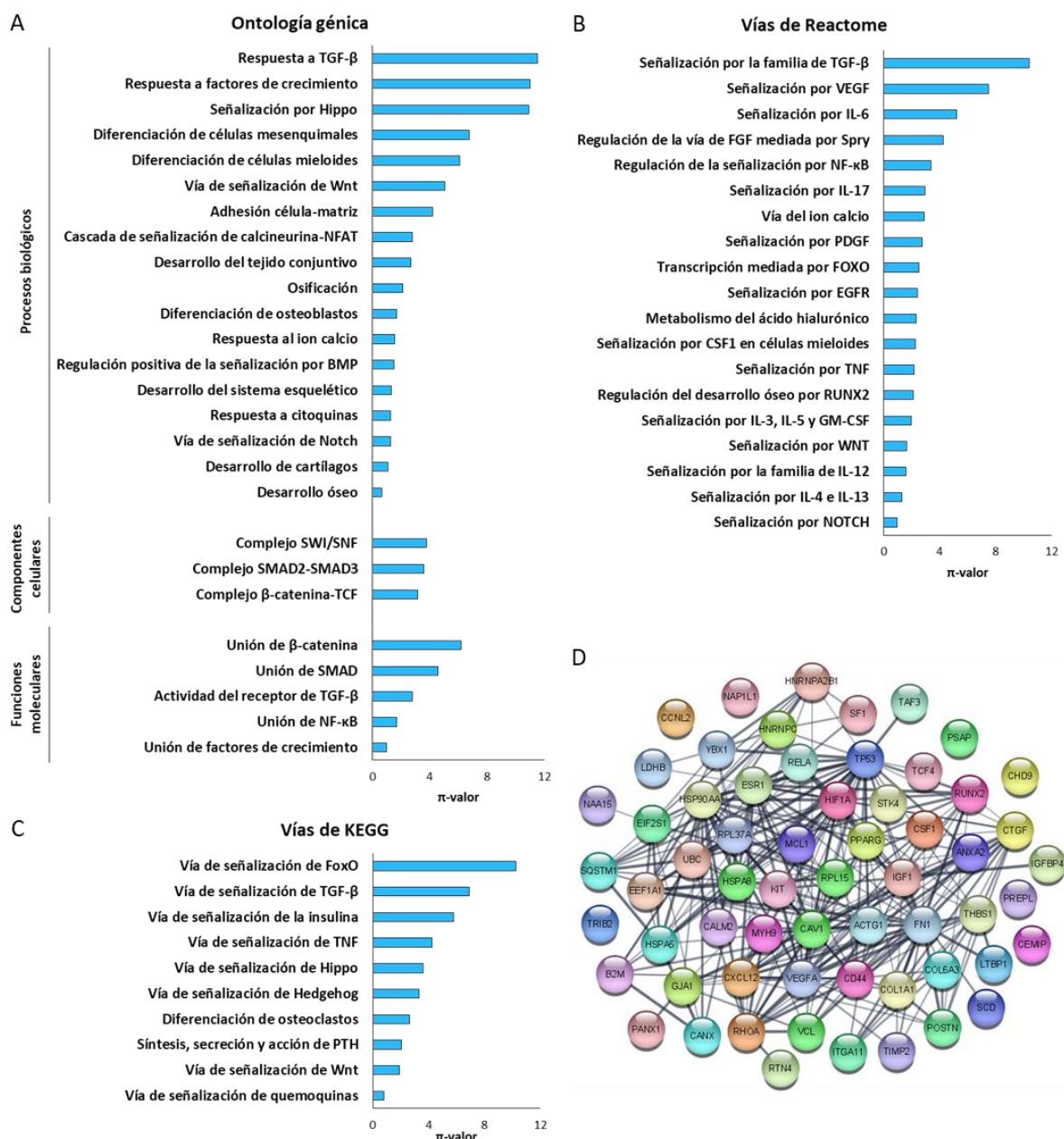


Figura 39. Análisis de ontología génica, vías de Reactome y vías KEGG de los 2.044 mRNAs pertenecientes a la posible red de regulación en la célula receptora de las vesículas extracelulares.

La figura muestra las categorías de ontología génica (A), Reactome (B) y KEGG (C) relacionadas con tejido óseo más significativamente representadas por los genes en estudio. π -valor calculado como $\text{Log}_2(\text{veces de enriquecimiento}) \times [-\text{Log}_{10}(p)]^{155}$. En el panel D se muestra la red de interacciones proteína-proteína obtenida mediante stringApp y Cytoscape relacionadas a los mRNAs presentes en las vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer de próstata y los mRNA que interaccionan con los lncRNA y miRNAs de las vesículas extracelulares. En esta figura se muestran los mRNA que codifican proteínas importantes en la fisiología ósea. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

4.7. *Análisis de la relevancia clínica de los lncRNAs y mRNAs identificados: Estudio de la asociación entre sus niveles en el tumor prostático primario y la sobrevida libre de progresión.*

Debido a que el contenido de las vesículas extracelulares refleja, al menos parcialmente, el contenido citoplasmático de la célula que les da origen, se decidió estudiar si los niveles de expresión en el tumor primario de todos los ARNs identificados hasta este punto tienen poder pronóstico en cuanto a la progresión del cáncer de próstata. Para esto se utilizaron los datos transcriptómicos de los tumores primarios de próstata de TCGA-PRAD (n = 482). Esta base de datos también cuenta con datos de distintos parámetros clínico-patológicos de los pacientes, entre ellos el tiempo de sobrevida libre de progresión (PFS) definido como el tiempo comprendido entre el momento del diagnóstico y la fecha de aparición de un nuevo evento tumoral (progresión de la enfermedad, recurrencia locorregional, metástasis a distancia, nuevo tumor primario o muerte del paciente con tumor) (**figura 40**).

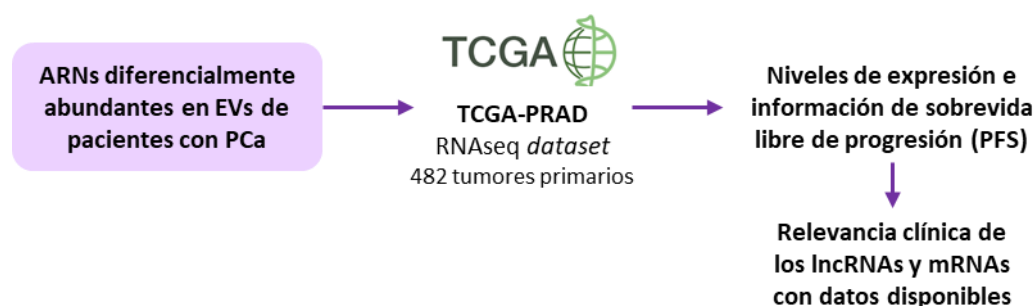


Figura 40. Estudio de la relevancia clínica de los lncRNAs y mRNAs identificados previamente utilizando la información provista por el set de datos de TCGA-PRAD. Análisis realizado con los datos clínico-patológicos de los pacientes con Cáncer de próstata y los niveles de expresión de los genes que codifican para los ARNs de interés en 482 tumores primarios.

En primer lugar, se analizó la asociación de los lncRNAs con la sobrevida libre de progresión. Se buscaron los 6 lncRNAs candidatos, pero solo había datos de expresión de 4 (*PCBP1-AS1*, *MIR646HG*, *LINC00506* y *LAMA5-AS1*) en TCGA-PRAD. Se utilizó la herramienta *Cutoff Finder* para categorizar a los pacientes en grupos de alta o baja expresión para cada gen. En la **figura 41A-D** se muestran las curvas de Kaplan-Meier según la expresión de los 4 lncRNAs y se informan los *Hazard Ratio* (HR) y *p* estimados según la regresión univariada de riesgos proporcionales de Cox. Se encontró que la alta expresión de *PCBP1-AS1* y *LAMA5-AS1* se asoció significativamente a una menor PFS, mientras que para *MIR646HG* y *LINC00506* la alta expresión se asoció significativamente con mejor PFS (**figura 41A-D**). Posteriormente, se decidió realizar un análisis multivariado incluyendo la expresión de los 4 lncRNAs para ajustar los HR por la expresión de los otros genes. Al plantear este modelo multivariado se mantuvo la significancia estadística de todos los lncRNA, indicando que son factores de riesgo independientes (**figura 41E**).

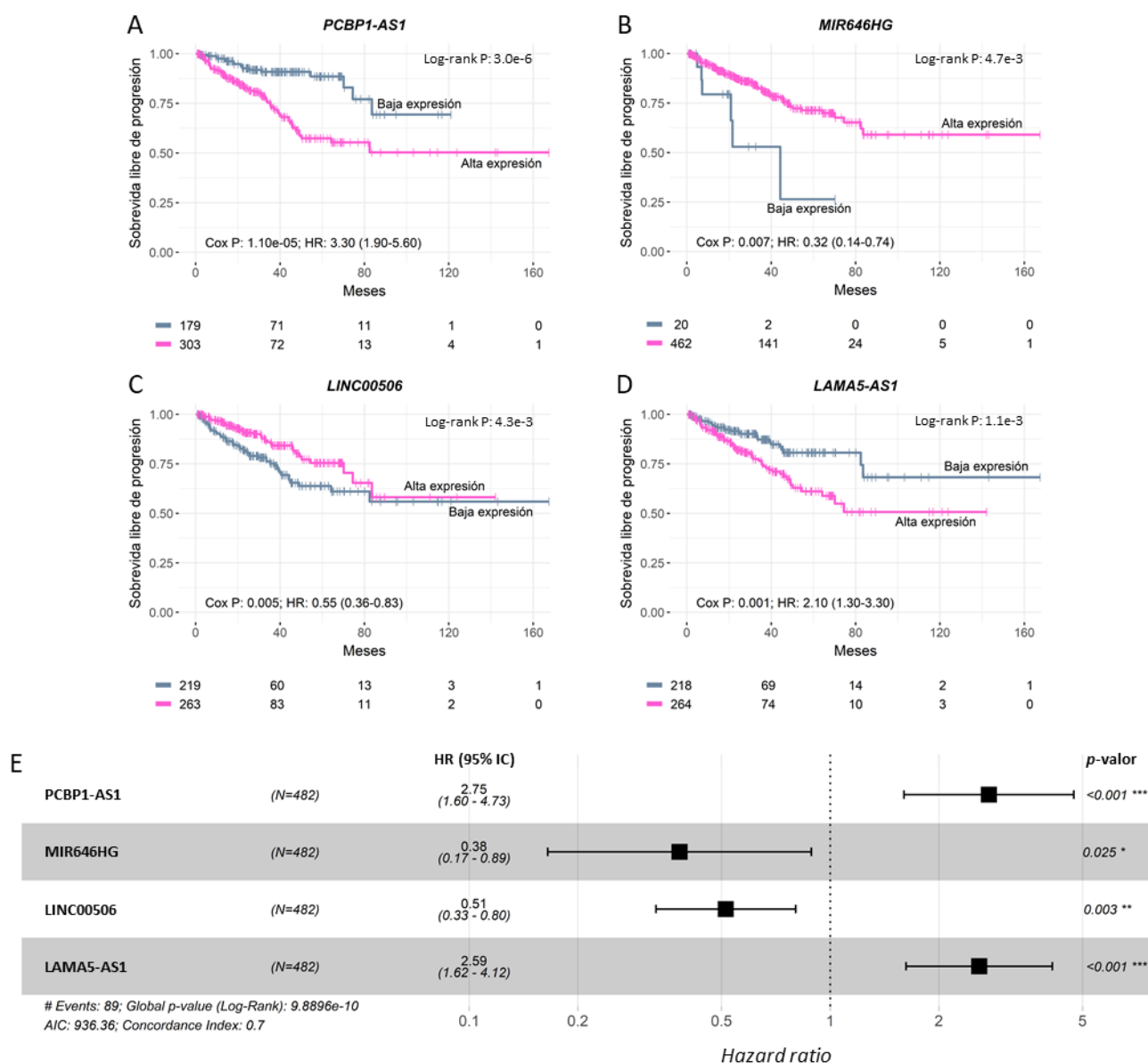


Figura 41. Análisis de la sobrevida libre de progresión (PFS) en función de la expresión de *PCBP1-AS1*, *MIR646HG*, *LINC00506* o *LAMA5-AS1*.

En los paneles A a D se muestran los análisis de PFS mediante curvas de Kaplan-Meier. En todos los casos, los pacientes fueron agrupados en alta o baja expresión de cada uno de los lncRNAs seleccionados. En cada gráfico se informa el p de Log-rank, el Hazard Ratio (HR) con su intervalo de confianza del 95% y el valor p de Cox univariado. Los números debajo de cada gráfico indican los pacientes en riesgo en cada lapso de tiempo para cada grupo. En el panel E se muestra un *Forest plot* en el que cada fila corresponde a una co-variable y en donde se indican los HR (cuadrados negros), 95% de intervalo de confianza (líneas negras horizontales) y el valor p de Cox, obtenidos en un análisis multivariado.

Habiendo confirmado que las expresiones de los 4 lncRNA son factores de riesgo independientes para la progresión del cáncer de próstata, se construyó una nueva variable que llamamos puntaje lncRNAs de riesgo de PFS y que incluye la información de la expresión de los 4 lncRNAs según la **fórmula 1** descrita en la sección 3.6.6. Luego de calcular el puntaje lncRNAs, los pacientes volvieron a categorizarse según un puntaje alto o bajo utilizando, nuevamente, la herramienta *Cutoff Finder*. El análisis de PFS por curvas de Kaplan-Meier y riesgos proporcionales de Cox mostró que los pacientes con un puntaje lncRNAs de riesgo alto tuvieron 4 veces más riesgo de progresar que los pacientes con un puntaje bajo (HR = 4,09 y $p = 5,62e-08$) (**figura 42A**).

Adicionalmente, se realizó un análisis multivariado que incluyó como co-variables al puntaje lncRNAs y parámetros clínico-patológicos de los pacientes como son el ISUP, PSA al diagnóstico y el estadio pT. En este análisis solo el puntaje lncRNAs e ISUP mostraron significancia estadística (**figura 42B**); por lo tanto, se redefinió el puntaje de riesgo para que incluyera ambas variables según la **fórmula 2** descrita en la sección 3.6.6. Este nuevo puntaje de riesgo, que llamamos puntaje lncRNAs + ISUP, permitió determinar que los pacientes con un puntaje alto tuvieron un riesgo de progresión casi 6 veces mayor que los pacientes con un puntaje bajo (HR = 5,74 y $p = 8,86\text{e-}16$; **figura 43A**).

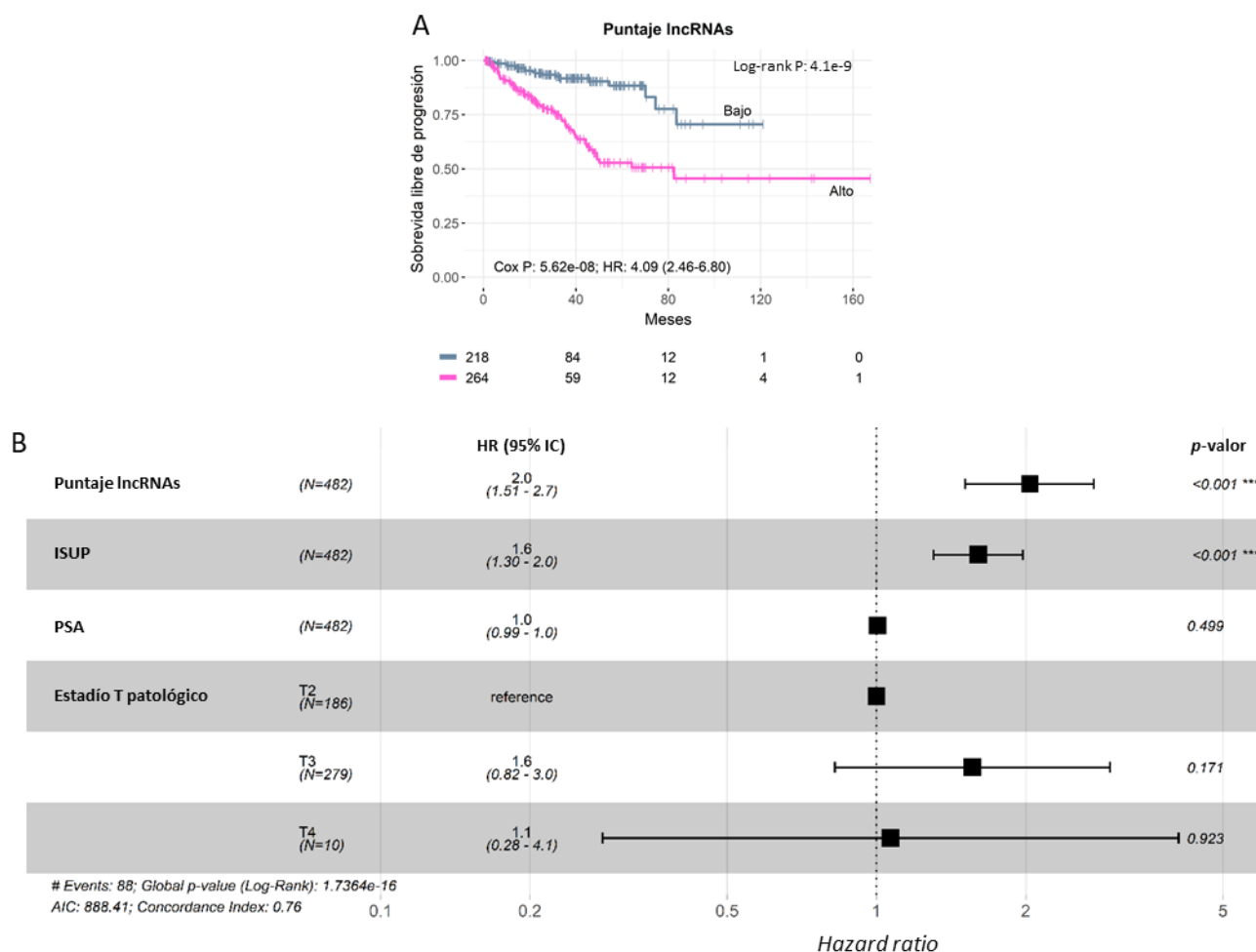


Figura 42. Análisis de la sobrevida libre de progresión (PFS) en función del puntaje lncRNAs.

En el panel A se muestra los análisis de PFS mediante curvas de Kaplan-Meier, categorizando a los pacientes en alto o bajo puntaje lncRNA. En cada gráfico se informa el p de Log-rank, el Hazard Ratio (HR) con su intervalo de confianza del 95% y el valor p de Cox univariado. Los números debajo de cada gráfico indican los pacientes en riesgo en cada lapso de tiempo para cada grupo. En el panel B se muestra un *Forest plot* en el que cada fila corresponde a una co-variable y en donde se indican los HR (cuadrados negros), 95% de intervalo de confianza (líneas negras horizontales) y el valor p de Cox, obtenidos en un análisis multivariado.

Finalmente, para evaluar el poder predictivo del puntaje lncRNAs como biomarcador de pronóstico de cáncer de próstata, solo o en conjunto con el grupo ISUP, se recurrió a la construcción de curvas ROC¹⁴⁸ y al cálculo del área bajo la curva (AUC) como indicador de la capacidad discriminatoria. Mediante este abordaje, se pudo corroborar que, si bien el puntaje lncRNAs (AUC = 0,682) posee un menor poder predictivo en comparación

con el parámetro histológico de grupo ISUP (AUC = 0,737), el modelo que incluye a ambos de forma conjunta aumenta significativamente el valor pronóstico de ambos parámetros por separado (AUC = 0,780; $p = 0,01$ vs AUC = 0,737 del grupo ISUP) (**figura 43B**).

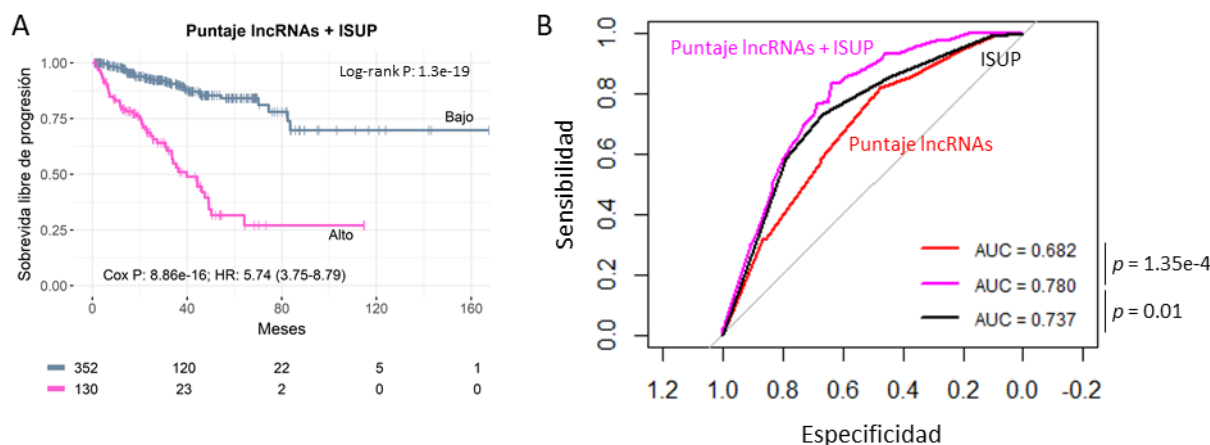


Figura 43. Estudio del poder predictivo del puntaje lncRNAs + ISUP como biomarcador de pronóstico de PFS.

(A) Curvas de Kaplan-Meier para la PFS de pacientes categorizados de acuerdo a un puntaje lncRNAs + ISUP alto o bajo. Los números debajo de cada gráfico indican los pacientes en riesgo en cada lapso de tiempo para cada grupo. (B) Análisis de curvas ROC para el puntaje lncRNAs, grupos ISUP y puntaje lncRNAs + ISUP. AUC: Área bajo la curva.

En paralelo, se realizó un análisis similar para los 15 mRNAs identificados en las vesículas extracelulares de los pacientes con cáncer de próstata, utilizando también los datos transcriptómicos disponibles en TCGA-PRAD. Se encontró que la alta expresión de *DLGAP3*, *HASPIN*, *WDR24*, *CDHR1* y *CDC26*, y la baja expresión de *HADHA*, *TCEAL8*, *NEXMIF*, *ANGPT1*, *ASTN2*, *PPM1D*, *ZNF90* y *RMND5A* se asociaron significativamente con menor PFS (**figura 44**). No se observaron diferencias significativas para *SHISA9* y *VPS37B* (resultados no mostrados).

Luego, se continuó realizando un modelo estadístico multivariado incluyendo la expresión de todos los 13 genes que mostraron una asociación significativa con la PFS como co-variables. Los resultados mostraron que 6/13 mRNAs (*HADHA*, *DLGAP3*, *ANGPT1*, *HASPIN*, *CDHR1* y *CDC26*) mantenían la significancia estadística, indicando que son factores de riesgo de progresión independientes. En la **figura 45** se muestran estos resultados en forma de *Forest plot*. Con estos 6 genes, se modeló un puntaje mRNAs según la **fórmula 1**, descrita en la sección 3.6.6, y se categorizó a los pacientes en alto o bajo puntaje tomando como punto de corte el determinado con la herramienta *Cutoff Finder*. El análisis de PFS demostró que los pacientes con un puntaje mRNAs alto tenían 7 veces más riesgo de progresar comparado a los pacientes con un puntaje mRNAs bajo (HR = 7,03 y $p = 1,26 \times 10^{-19}$) (**figura 46A**).

Habiendo determinado que el puntaje mRNAs se asoció significativamente con la PFS, se realizó un análisis incluyendo el puntaje mRNAs, ISUP, nivel de PSA al diagnóstico y el estadio pT como co-variables. En este modelo solo el puntaje mRNAs y el ISUP resultaron factores de riesgo independientes (**figura 46B**). Por lo tanto, se definió un nuevo puntaje de riesgo que llamamos puntaje mRNAs + ISUP según la **fórmula 2**, descrita en la sección 3.6.6, y se estratificó a los pacientes según un puntaje mRNAs + ISUP alto o bajo. El análisis de PFS demostró que los pacientes con un puntaje mRNAs + ISUP alto tuvieron casi 8 veces más riesgo de progresar que los pacientes con un puntaje bajo (HR = 7,74 y $p = 3,34 \times 10^{-21}$) (**figura 47A**). Finalmente, se realizó un análisis de curvas ROC para evaluar el poder predictivo de este puntaje mRNAs + ISUP, y se demostró que el puntaje

mRNAs + ISUP mejoró significativamente el poder predictivo del grado ISUP solo (AUC mRNAs + ISUP = 0,820 vs AUC ISUP = 0,737; $p = 5,18\text{e-}5$; **figura 47B**).

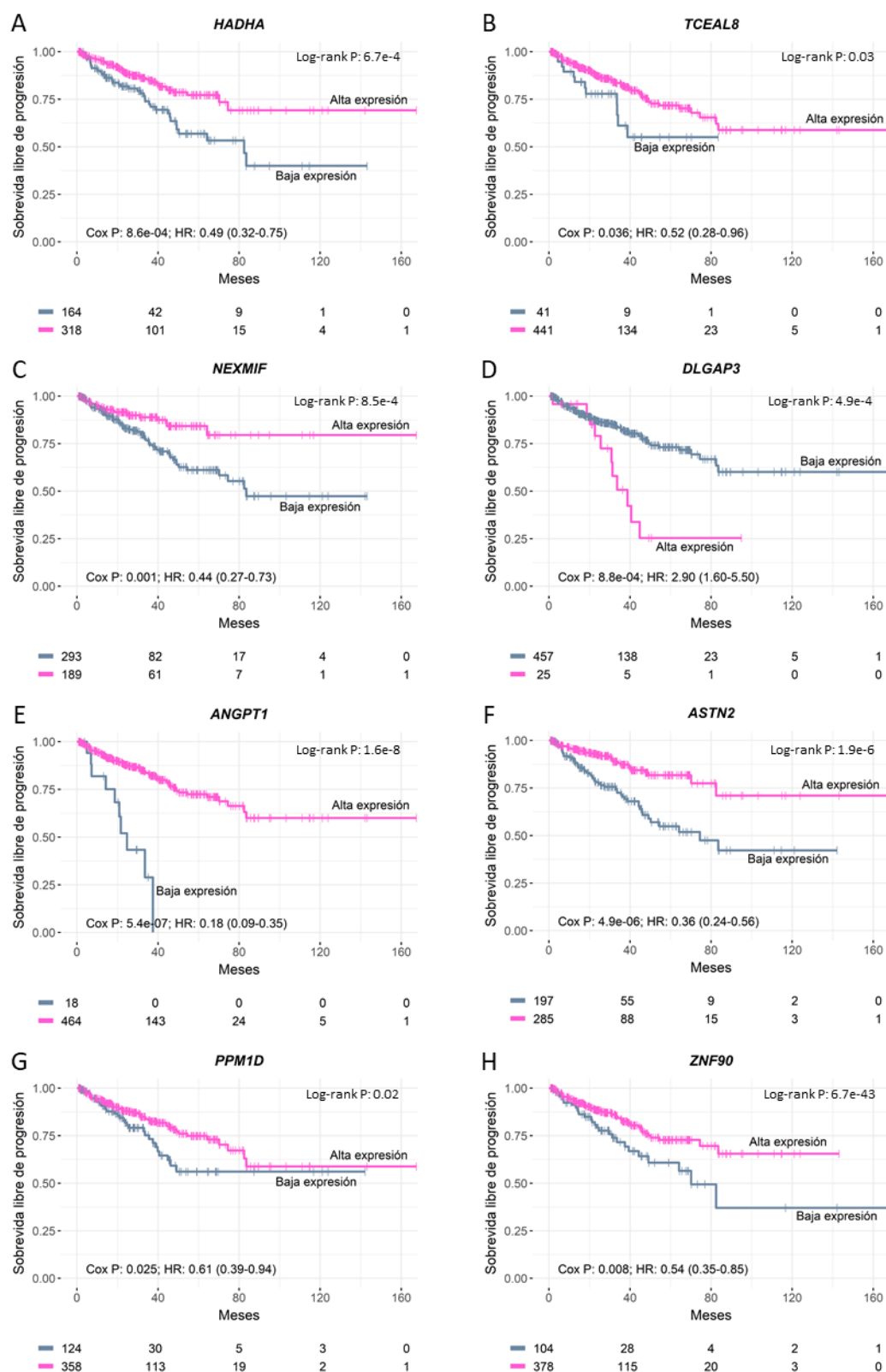


Figura 44. Continúa.

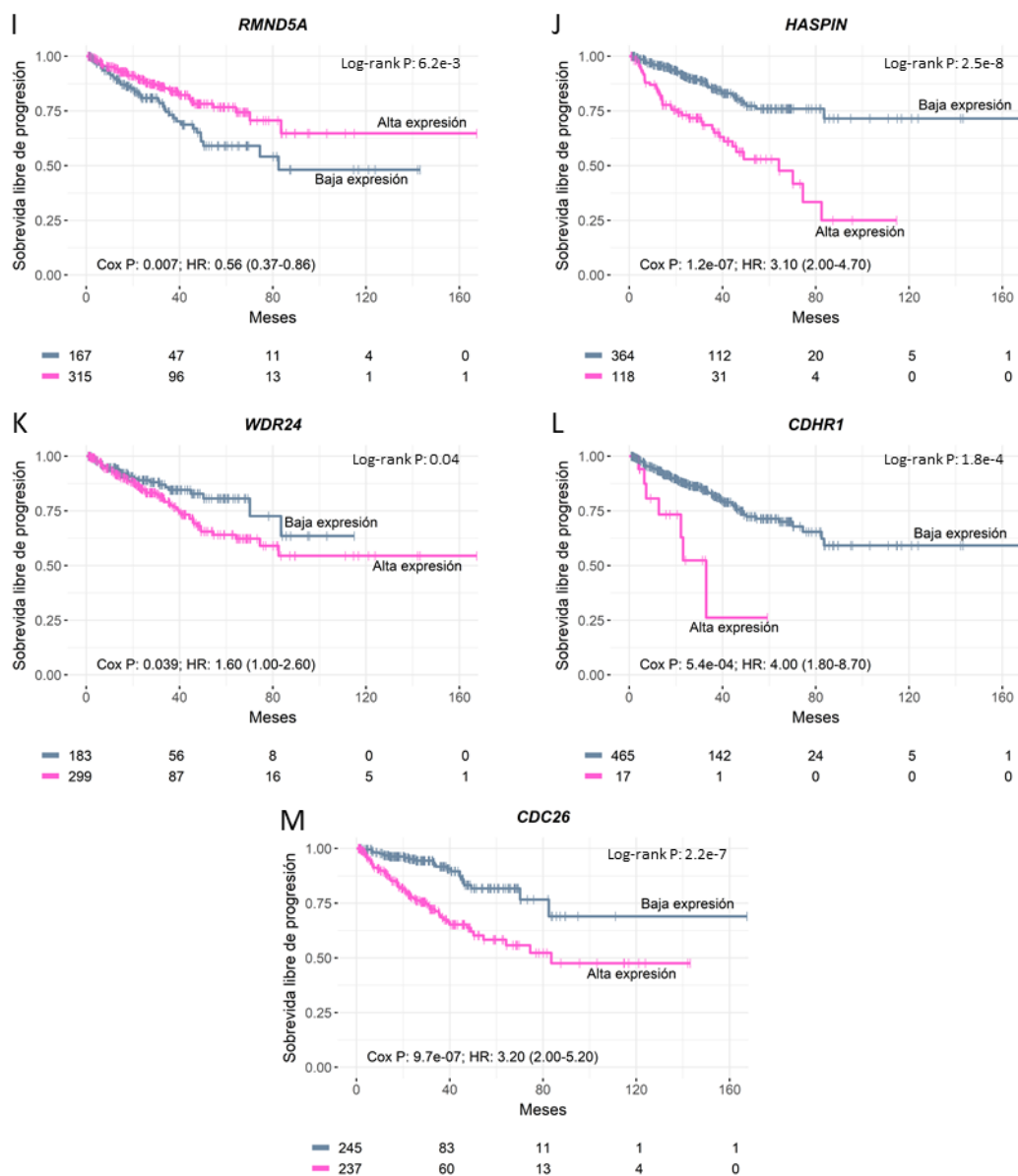


Figura 44. Análisis de la PFS en función de la expresión de los mRNAs candidatos.

En la figura se muestran las curvas de Kaplan-Meier para los 13 mRNAs cuya expresión se asoció significativamente con la PFS. En cada gráfico se informa el Log-rank, el HR (95% intervalo de confianza), y el Cox p univariado. Los números debajo de cada gráfico indican los pacientes en riesgo en cada lapso de tiempo para cada grupo.

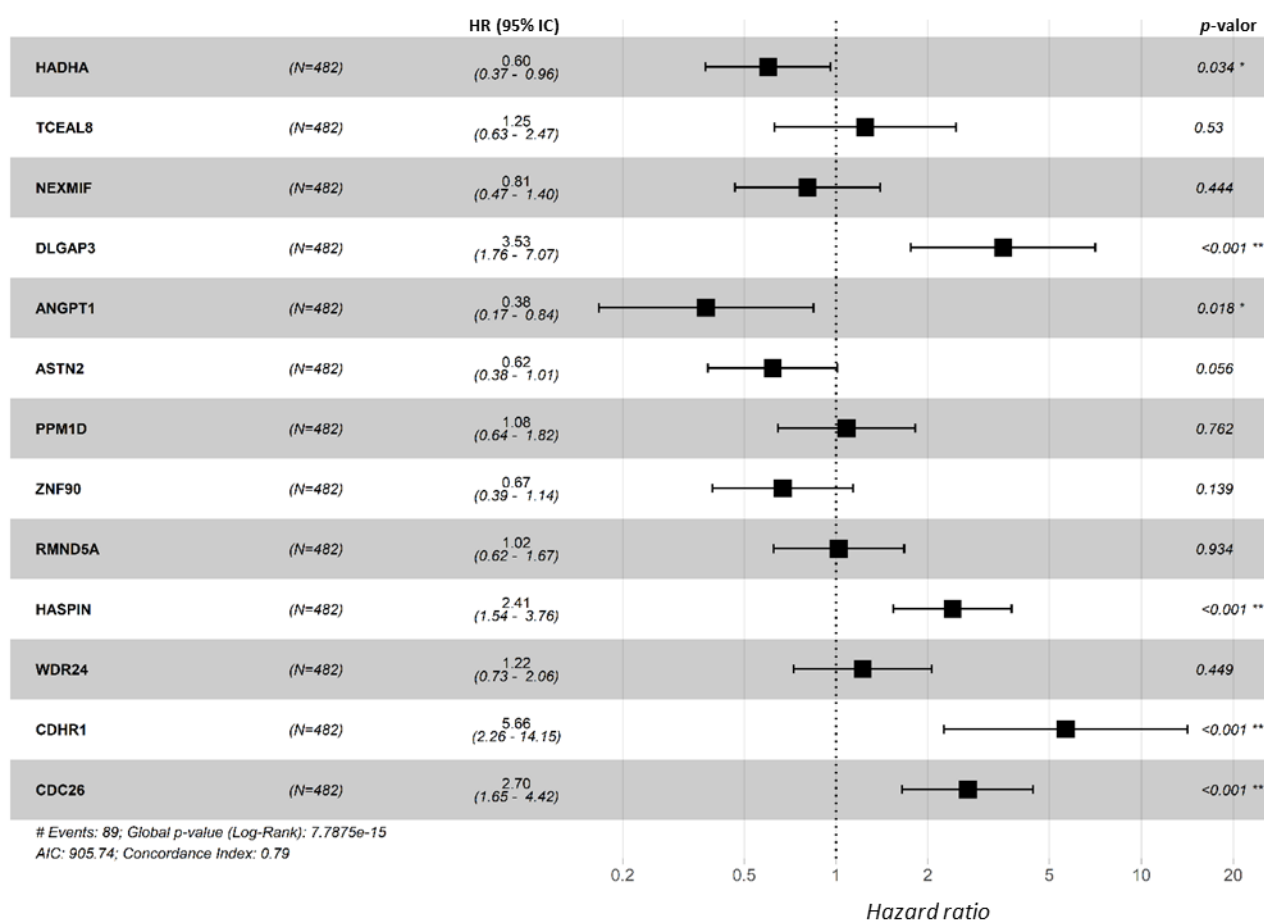


Figura 45. Resultado del análisis multivariado de los mRNAs como predictores de PFS.

La figura muestra en forma de *Forest plot* en el que cada fila corresponde a uno de los 13 mRNA y en donde se indican los HR (cuadrados negros), 95% de intervalo de confianza (líneas negras horizontales) y el valor p de Cox, obtenidos en un análisis multivariado.

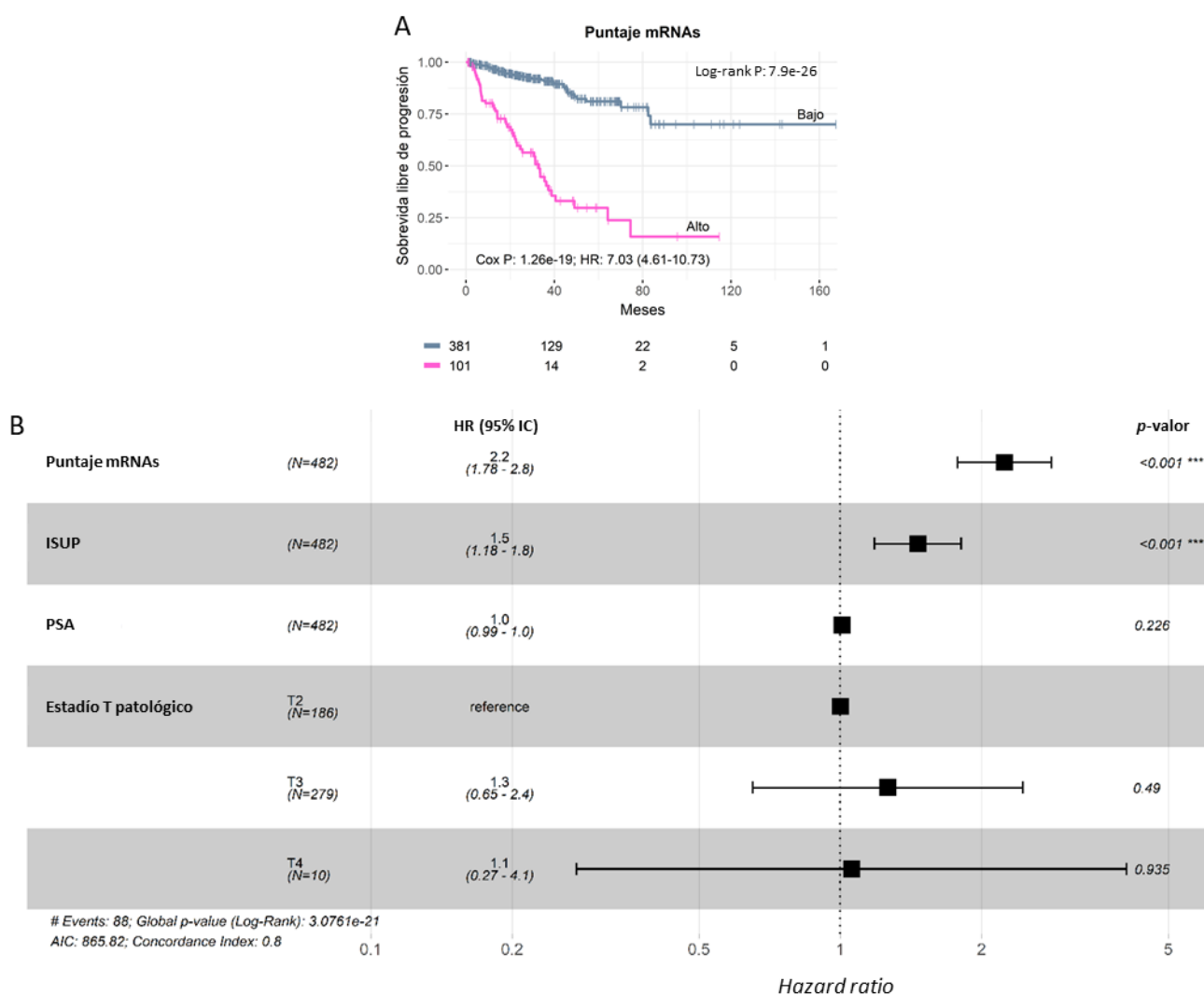


Figura 46. Evaluación de la utilidad del puntaje mRNAs para predecir el riesgo de progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de próstata.

En el panel A se muestra los análisis de PFS mediante curvas de Kaplan-Meier, categorizando a los pacientes en alto o bajo puntaje lncRNA. En cada gráfico se informa el p de Log-rank, el Hazard Ratio (HR) con su intervalo de confianza del 95% y el valor p de Cox univariado. Los números debajo de cada gráfico indican los pacientes en riesgo en cada lapso de tiempo para cada grupo. En el panel B se muestra un *Forest plot* en el que cada fila corresponde a una co-variable y en donde se indican los HR (cuadrados negros), 95% de intervalo de confianza (líneas negras horizontales) y el valor p de Cox, obtenidos en un análisis multivariado.

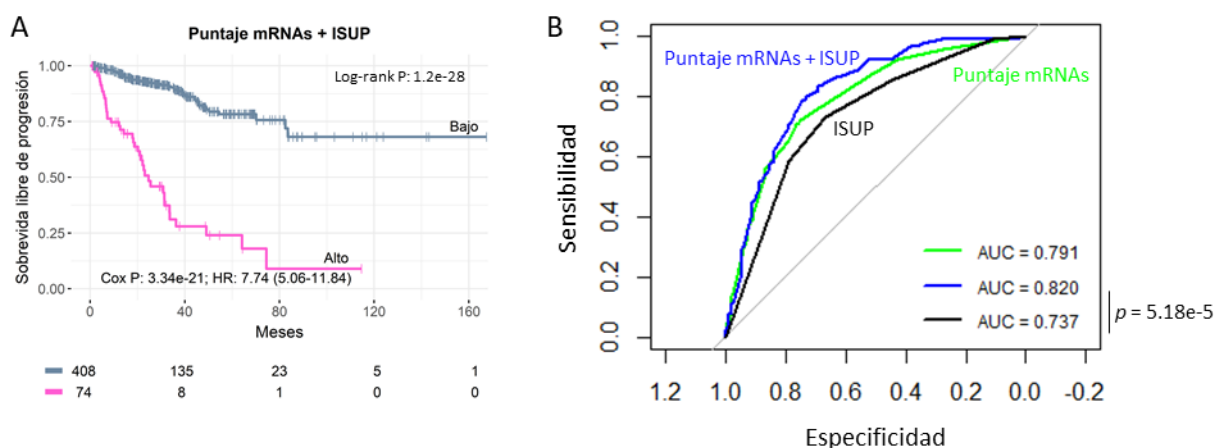


Figura 47. Estudio del poder predictivo del puntaje mRNAs + ISUP como biomarcador de pronóstico de PFS.

(A) Curvas de Kaplan-Meier para la PFS de pacientes categorizados de acuerdo a un puntaje mRNAs + ISUP alto o bajo. Los números debajo de cada gráfico indican los pacientes en riesgo en cada lapso de tiempo para cada grupo. (B) Análisis de curvas ROC para el puntaje mRNAs, grupos ISUP y puntaje mRNAs + ISUP. AUC: Área bajo la curva.

Posteriormente, habiendo determinado que los puntajes lncRNAs y mRNAs agregan poder predictivo a uno de los parámetros más utilizados en cáncer de próstata —el grupo ISUP—, se decidió definir un nuevo modelo predictivo de PFS que incluyera los 3 parámetros como co-variables. En la **figura 48A** se muestran los resultados de este análisis, en donde se pudo comprobar que las 3 co-variables son factores de riesgo independientes para la predicción de la PFS. Por lo tanto, se creó un nuevo puntaje de riesgo conteniendo estas 3 variables según la **fórmula 3** descrita en la sección 3.6.6, al que llamamos puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP. Al categorizar a los pacientes según este puntaje, se observó que los pacientes con un puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP alto tuvieron más de 8 veces más de riesgo de progresión que los pacientes con un puntaje bajo (HR = 8,25 y $p = 2,53e-21$) (**figura 48B**); y este puntaje combinado mejora el poder predictivo del grupo ISUP (AUC = 0,831 para el puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP vs AUC = 0,737 para ISUP; $p = 3,14e-5$) (**figura 48C**).

Para validar estos resultados, se empleó un método de análisis alternativo utilizando el paquete de R *asuri* que permite calcular el riesgo de PFS usando una estrategia estadística distinta y calculando un nuevo punto de corte para categorizar a los pacientes en alto o bajo riesgo. Mediante este método se corroboraron los resultados anteriores, observando que los pacientes con puntajes lncRNAs + mRNAs + ISUP altos tuvieron un riesgo 9 veces más alto de progresar que los pacientes con un puntaje bajo (HR = 9,17 y $p = 1,44e-26$) (**figura 49**).

Finalmente, se compararon ambos métodos de predicción para evaluar la performance en la detección de pacientes que van a progresar (llamaremos método 1 a la predicción mediante el puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP descrito en esta tesis, y método 2 a la predicción por *asuri*). El método 1 clasifica con puntaje alto a 53 pacientes; mientras que el método 2 clasifica con puntaje alto a 165 pacientes, que incluyen a los 53 con puntaje alto por el método 1 (**figura 50A**). En la tabla de la **figura 50B**, se muestra la performance de ambos métodos para detectar a los pacientes que progresan. El método 1 tiene una buena capacidad para identificar, al momento del diagnóstico, a los pacientes que no progresaron, pero solo detectó correctamente al 37% de los pacientes que progresaron (**figura 50B**); lo que podría llevar a un sub-tratamiento de los pacientes. Por el contrario, el método 2 detecta, al momento del diagnóstico, al 76% de los pacientes que luego progresaron, pero a expensas de tener una mayor proporción de falsos positivos (25% vs 5%, método 2 y 1,

respectivamente); lo que podría llevar a un sobre-tratamiento de los pacientes (**figura 50B**). Lo que resulta interesante, es que el método 2 fue capaz de identificar varios pacientes que progresaron en los grupos ISUP bajos; es decir, pacientes cuyas características histopatológicas de los tumores indicaban que eran de bajo grado y con poca probabilidad de progresar (**figura 50C**). Por lo tanto, el puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP podría ser una herramienta adicional para identificar pacientes con tumores agresivos que histopatológicamente tienen características de tumores de bajo grado y con poco riesgo de progresar. La detección de estos tumores agresivos al momento del diagnóstico es de suma importancia para poder darle al paciente el mejor tratamiento desde el inicio, reduciendo al mínimo el riesgo de metástasis, recaída y/o muerte.

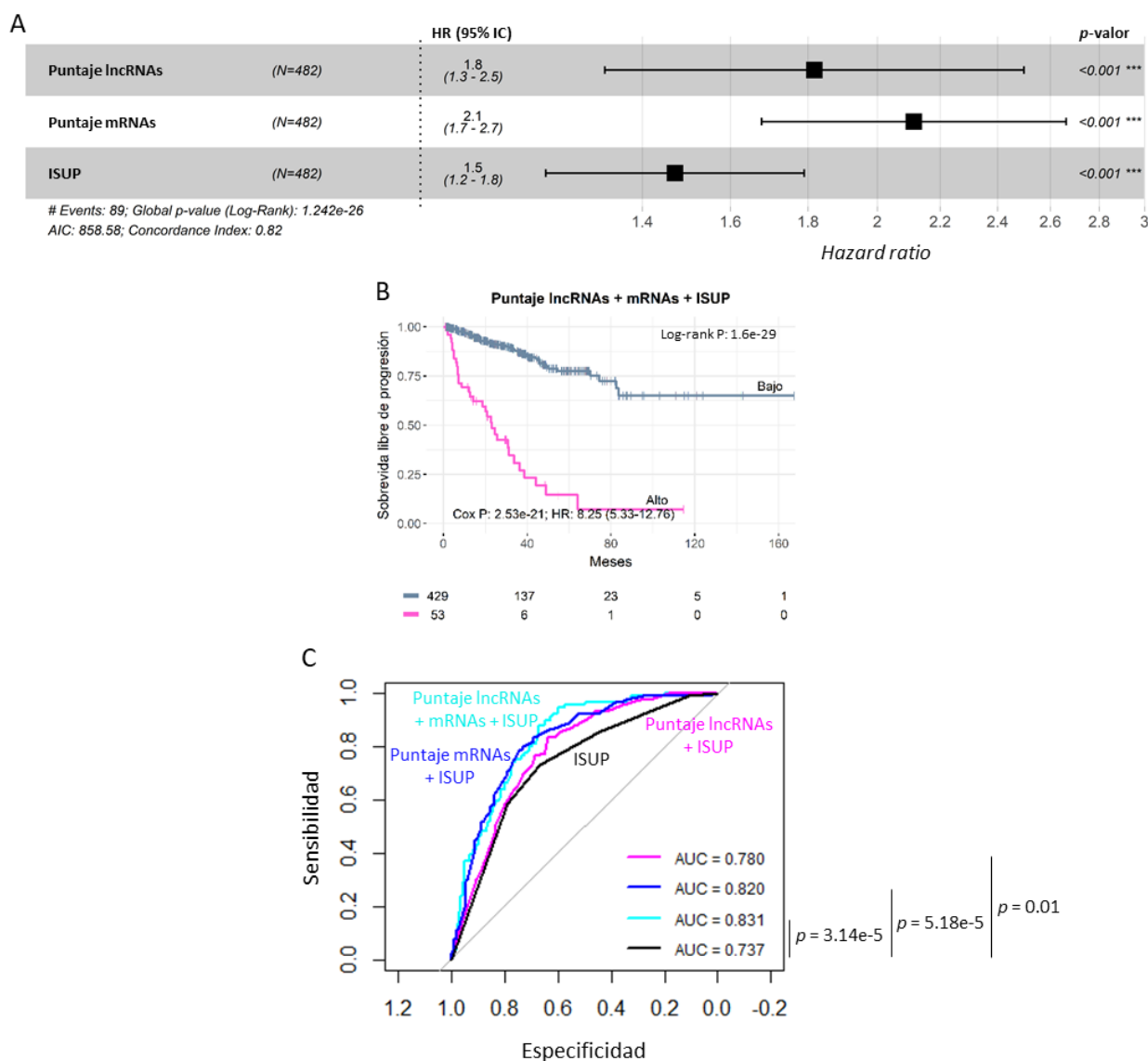


Figura 48. Modelado de un puntaje predictivo de PFS que incluye datos de expresión de lncRNAs, mRNAs y el grado ISUP de los tumores prostáticos.

En el panel A se muestra un *Forest plot* en el que cada fila corresponde a una co-variables y en donde se indican los HR (cuadrados negros), 95% de intervalo de confianza (líneas negras horizontales) y el valor *p* de Cox, obtenidos en un análisis multivariado. El panel B corresponde a la curva de Kaplan-Meier para PFS de pacientes categorizados de acuerdo a un puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP alto o bajo. Los números debajo de cada gráfico indican los pacientes en riesgo en cada lapso de tiempo para cada grupo. En C se muestra el análisis de curvas ROC para el puntaje lncRNAs + ISUP, puntaje mRNAs + ISUP, puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP, y grupos ISUP. AUC: Área bajo la curva.

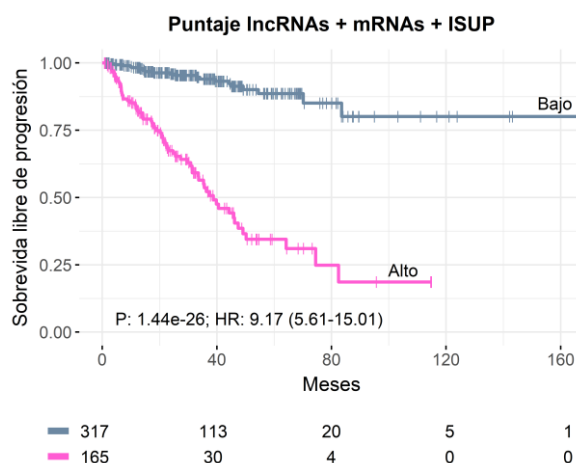


Figura 49. Validación del modelo final del puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP utilizando el paquete de R *asuri*.

Se muestra la curva de Kaplan-Meier para PFS de pacientes categorizados de acuerdo a un puntaje lncRNAs + mRNAs + ISUP alto o bajo según el paquete de R *asuri*. Los números debajo del gráfico indican los pacientes en riesgo en cada lapso de tiempo para cada grupo.

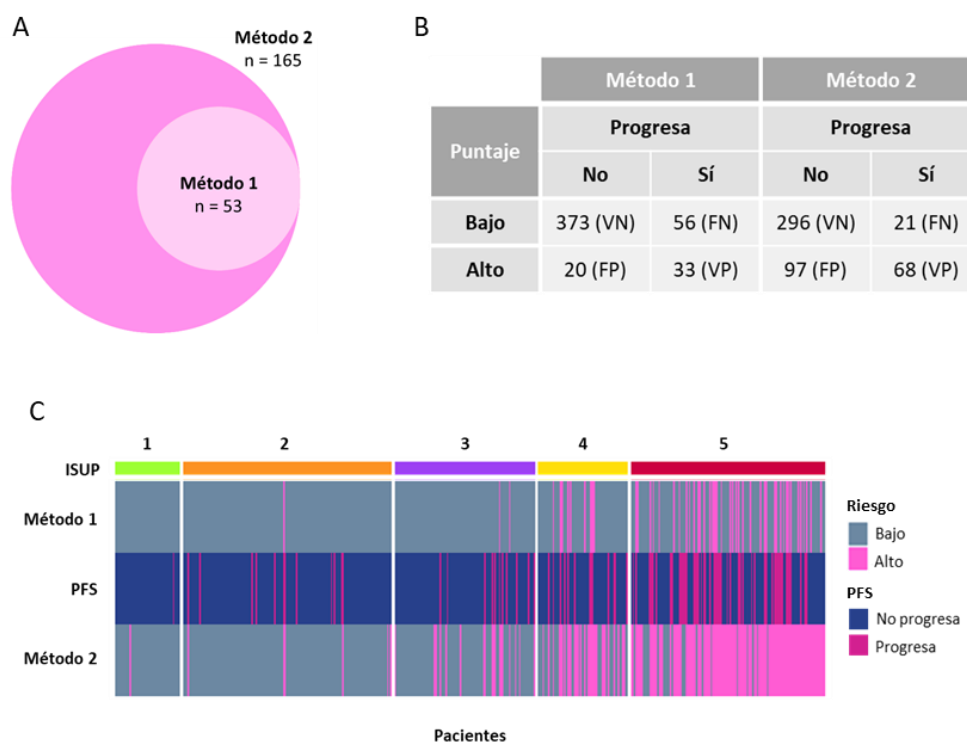


Figura 50. Comparación entre los dos métodos empleados para predecir el riesgo de progresión utilizando los puntajes lncRNAs + mRNAs + ISUP.

Diagrama de Venn con los pacientes de puntaje alto de acuerdo a cada método empleado (A). Comparación de la distribución de los pacientes categorizados con puntaje de alto o bajo riesgo por ambos métodos y evolución de la enfermedad en forma de tabla (B) y de esquema comparativo (C). El panel C representa a todos los pacientes categorizados por grado ISUP (barras de colores superiores), el puntaje asignado a cada uno por los métodos 1 y 2 (mostrado como código de colores gris y rosa), y si sufrieron progresión de la enfermedad (mostrado como código de colores azul y violeta).

FN: falsos negativos; FP: falsos positivos; VN: verdaderos negativos; VP: verdaderos positivos; PFS: sobrevida libre de progresión.

5. Discusión

En Argentina, el cáncer de próstata es el cáncer más comúnmente diagnosticado y se ubica como la tercera causa de muerte por cáncer en hombres, por detrás del cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal⁷. Se caracteriza por poseer un amplio espectro de presentaciones clínicas, desde tumores indolentes hasta tumores altamente agresivos que comprometen la vida de los pacientes. Mientras se encuentra localizado suele ser curable pero cuando la enfermedad escapa de la glándula los pronósticos de cura disminuyen drásticamente, siendo las metástasis la principal causa del deterioro de la calidad de vida y muerte¹⁵⁶. La diseminación de los tumores prostáticos muestra tropismo preferencial por el hueso como sitio de progresión, donde las células tumorales interactúan con el microambiente interrumpiendo el equilibrio de formación y degradación del tejido óseo¹⁵⁷. Sin embargo, hasta el momento, la biología molecular de las interacciones célula tumoral prostática-célula ósea es en gran parte desconocida. Por lo tanto, en esta tesis se propuso el objetivo general de estudiar la comunicación intercelular entre las células tumorales prostáticas y las células óseas, centrándose en la comunicación a través de vesículas similar exosomas (ELVs); e identificar mecanismos moleculares involucrados en esta interacción intercelular. Los resultados presentados demuestran que las células prostáticas liberan ELVs que transportan ARNs codificantes y no codificantes que pueden modular la expresión de vías moleculares relacionadas con la fisiología de las células óseas receptoras.

El concepto de que la diseminación metastásica del cáncer no es aleatoria fue propuesta por Steven Paget en 1889 bajo el nombre de “teoría de semilla y suelo (*seed and soil*)”¹⁵⁸. Paget propuso que la diseminación de las células tumorales es posible gracias a la interacción y cooperación entre las células tumorales (*seed* o semilla) y las células del órgano receptor (*soil* o suelo). Hoy en día se sabe que el tumor primario prepara el microambiente metastásico mediante la producción de factores que favorecen la colonización del tejido receptor, y que las células del órgano receptor favorecen el crecimiento de las células tumorales¹⁵⁹.

En estudios de nuestro laboratorio se demostró que las células tumorales prostáticas humanas PC3 inhiben la proliferación de cultivos primarios de osteoblastos murinos y liberan factores que impiden la diferenciación de los mismos¹⁵¹. Se observaron niveles de expresión significativamente mayores de anexina A2 (*ANXA2*) — una proteína importante en la fisiología ósea y la progresión del cáncer de próstata— y su receptor (*ANXA2-R*) en las células PC3 en co-cultivo indirecto con células preosteoclasticas murinas Raw264.7¹⁵³. Además, en las células Raw264.7 en co-cultivo con PC3 se observó una disminución en la expresión de *ANXA2* y una menor localización de *ANXA2* en la membrana celular; mientras que, por medio del análisis de las proteínas liberadas al medio de cultivo, se identificó a la uroquinasa (uPA) como un factor clave en la comunicación entre ambas líneas celulares¹⁵³. Adicionalmente, al incubar un mono-cultivo de células PC3 con el medio condicionado proveniente de un co-cultivo entre PC3 y preosteoblastos murinos MC3T3, se evidenció una reducción en la densidad de filopodios y contactos célula-célula en comparación con el cultivo de PC3 con medio fresco¹⁵². Finalmente, a partir del transcriptoma de las células PC3 en co-cultivo indirecto con Raw264.7 o MC3T3, también fue posible identificar un perfil génico involucrado en el metabolismo lipídico y que está asociado con la capacidad de las células de cáncer de próstata para invadir el nicho óseo¹⁶⁰.

Se ha demostrado que las células óseas producen factores que aumentan el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales prostáticas y que esta interacción, a su vez, favorece la progresión metastásica¹⁶¹. Sin embargo, la naturaleza molecular de la interacción célula tumoral prostática-célula ósea aún no se conoce completamente y existen pocos modelos experimentales apropiados para estudiarla. Muchos trabajos se focalizan en analizar los factores solubles como uno de los responsables del establecimiento de enfermedad metastásica; sin embargo, es creciente la evidencia que demuestra que las vesículas extracelulares estarían involucradas, al menos en parte, en este proceso.

Las células son capaces de secretar vesículas extracelulares, cuya función es la de intercambiar distintas moléculas entre las células (ácidos nucleicos, lípidos y proteínas), actuando como vesículas de señalización

intercelular en procesos tanto homeostáticos como patológicos⁷¹. Se ha descrito que los exosomas tienen funciones durante la respuesta inmune, la progresión tumoral y en enfermedades neurodegenerativas¹⁶²; y que cuando las células sufren algún tipo de estrés, la liberación de estas vesículas aumenta y su contenido cambia^{163–165}. Esto es particularmente importante en las células tumorales porque están sujetas a estrés por hipoxia, deficiencia de nutrientes y otros factores extracelulares; habiéndose reportado varios ejemplos en los que se demostró que los pacientes con cáncer tienen exosomas con mayor contenido de proteínas y ARNs no codificantes asociados a características más agresivas de los tumores o a peor pronóstico¹⁶⁶.

Pan *et al.* publicaron un artículo de revisión que compila trabajos en donde se demuestra que los exosomas derivados de tumores prostáticos están involucrados en la progresión tumoral, metástasis y resistencia a drogas¹⁶⁷. Se ha evidenciado que los exosomas liberados por las células tumorales prostáticas promueven la diferenciación y fusión de osteoclastos para favorecer la metástasis ósea¹⁶⁸, contienen TGF- β que induce la diferenciación de las células madre óseas a fibroblastos¹⁶⁹, y que en pacientes con cáncer de próstata metastásico este tipo de vesículas posee un alto contenido de miR-21 y miR-141^{170,171}. También se demostró que los exosomas aislados de suero de pacientes con adenocarcinoma prostático primario promueven el crecimiento del tumor en el hueso en un modelo murino¹²¹. Esos mismos exosomas no modificaron el crecimiento de líneas celulares derivadas de tumores prostáticos humanos, pero promovieron el crecimiento de estas células cuando se co-inocularon con células estromales de médula ósea¹²¹. Estudios *in vitro* también demostraron que la línea celular derivada de un tumor prostático humano LNCaP produce exosomas capaces de aumentar la proliferación de la línea celular de osteoblastos hFOB1.19 al estar en co-cultivo¹⁷². El efecto observado se debió a la presencia del miR-375 exosomal liberado por la línea LNCaP. Otro trabajo reportó que los exosomas de la línea celular de adenocarcinoma prostático humano PC3 inhiben la diferenciación de pre-osteoclastos aislados de células mononucleadas de sangre periférica humana, y esta inhibición fue mayor a medida que se incrementó la cantidad de exosomas con los que se cultivaron los pre-osteoclastos, observándose un efecto del tipo dosis-respuesta¹⁷³. En conjunto, estos resultados demuestran que los exosomas liberados por las células tumorales prostáticas condicionan el microambiente metastásico para que la célula tumoral pueda colonizar, preferentemente, el tejido óseo. Sin embargo, todavía siguen sin conocerse todos los procesos moleculares involucrados en estas interacciones.

En esta tesis se demostró que las ELVs derivadas de células PC3 inducen cambios morfológicos en las células pre-osteoclásticas Raw264.7 receptoras, las cuales en su condición control son mayoritariamente redondeadas; pero luego de ser cultivadas en presencia de estas vesículas adquirieron una morfología de tipo fusiforme con múltiples prolongaciones que podría ser compatible con un estadio de diferenciación osteoclástica temprana^{174,175}. A pesar de que las metástasis óseas del cáncer de próstata suelen ser predominantemente osteoblásticas¹⁷⁶, no todas presentan el mismo perfil y es frecuente que muestren en simultáneo elementos osteolíticos y osteoblásticos¹⁷⁷. Particularmente, las células PC3 generan metástasis de tipo osteoclástico¹⁷⁸, por lo que estas alternaciones morfológicas observadas en este trabajo confirmarían estos antecedentes e indicarían que el perfil osteoclástico en el hueso estaría inducido por las ELVs. Para corroborar estos hallazgos, sería necesario realizar los cultivos de células Raw264.7 expuestas a ELVs de PC3 por períodos más prolongados y verificar la diferenciación de las células a osteoclastos (células grandes con presencia de múltiples núcleos por la fusión de los pre-osteoclastos, y aumento de la expresión de la fosfatasa ácida resistente al tartrato)¹⁷⁹.

Además, mediante un abordaje transcriptómico de las células receptoras, se evidenció que las ELVs derivadas de PC3 producen cambios moleculares, modulando vías relacionadas con procesos fundamentales para la fisiología del hueso. En las células MC3T3 expuestas a las ELVs se observaron cambios de expresión génica en vías relacionadas con: i) metabolismo del calcio y del fósforo que tienen un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis ósea¹⁸⁰; ii) unión de vitamina B6, cuya deficiencia está asociada con una osificación defectuosa

y fue reportada como un factor de riesgo osteoporótico¹⁸¹; iii) señalización por receptores de membrana, adhesión celular y proliferación de células mesenquimales, linaje celular al cual pertenecen los osteoblastos¹⁸²; y iv) secreción y transporte de catecolaminas, un tipo de neurotransmisores que tienen una fuerte influencia en el metabolismo óseo, favoreciendo la osteoclastogénesis, la aparición de osteoporosis y el desarrollo de metástasis en hueso^{183–185}. En las células Raw264.7 se encontró que la exposición a las ELVs de PC3 produce cambios en la expresión de genes involucrados en vías vinculadas con: i) producción de citoquinas y quemoquinas, que son factores de gran importancia en múltiples etapas de la progresión tumoral y participan en el acondicionamiento del microambiente pre-metastásico y en el direccionamiento y establecimiento de las células tumorales en órganos distales¹⁸⁶; ii) transporte y señalización por calcio; iii) regulación del sistema inmune, lo cual podría estar relacionado con un rol inmunosupresor de los exosomas derivados de cáncer de próstata en el microambiente pre-metastásico, como fue observado en trabajos previos¹¹⁸; iv) transducción de señales; v) transporte transmembrana y vesículas, posiblemente asociados a una desregulación en la comunicación vesicular que puede establecerse desde las células óseas hacia el microambiente a nivel local y al tumor primario a distancia^{187–189}; y vi) regulación de la señalización por proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), que ejercen funciones en el tejido óseo sano pero también en estados patológicos^{190,191}.

La evaluación del contenido de ARNs de las ELVs derivadas de células PC3, focalizada especialmente en aquellos con funciones regulatorias a distintos niveles de la expresión génica, permitió identificar un subgrupo de miRNAs y lncRNAs que, de acuerdo al estudio de las funciones que tienen sus mRNAs blanco, explicarían parcialmente los efectos que producen estas vesículas extracelulares en las células progenitoras óseas. De todos modos, resta continuar profundizando el análisis de los datos obtenidos con el fin de caracterizar y validar alguna red de regulación central en la comunicación entre las células tumorales prostáticas y las células óseas mediada por ELVs. Esto permitirá ampliar el conocimiento sobre los mecanismos que posibilitan el establecimiento de las metástasis óseas del cáncer de próstata. En consecuencia, se podrían desarrollar nuevas terapias dirigidas a regular factores claves en estas interacciones con el objetivo de interferir en esas vías para retrasar o inhibir el desarrollo de tumores secundarios en el hueso, lo cual mejoraría considerablemente la sobrevida libre de metástasis, así como también la sobrevida global de los pacientes.

Es importante destacar que, ante la escasez de modelos experimentales para investigar los mecanismos que posibilitan la aparición de metástasis en hueso, se trabajó con un modelo mixto de células tumorales prostáticas humanas y células progenitoras óseas murinas; un modelo *in vitro* ampliamente aceptado y de uso habitual por nuestro grupo^{152,153,160,192}. Esto podría ser una limitación de este estudio ya que los resultados obtenidos podrían no corresponderse perfectamente con la comunicación intercelular en la enfermedad humana.

Si bien es posible diagnosticar el cáncer de próstata en etapas tempranas, continúa siendo un desafío poder predecir con precisión la evolución de la enfermedad para cada paciente en particular¹⁹³. Generalmente, los tumores prostáticos crecen muy lentamente, pudiendo permanecer indolentes por períodos de tiempo muy prolongados. Sin embargo, ante las dificultades para poder determinar con certeza el pronóstico, una alta proporción de pacientes con cáncer de próstata de baja agresividad que no afectaría considerablemente su salud, son sometidos innecesariamente a exámenes adicionales y tratamientos que, como consecuencia de sus efectos adversos, reducen su calidad de vida¹⁹³. De la misma manera, algunos pacientes pueden tener tumores con alta probabilidad de progresar, pero que histopatológicamente parecen tumores de bajo grado; haciendo que el médico indique esquemas de seguimiento activo y/o tratamientos poco agresivos, resultando en la progresión de la enfermedad y un alto compromiso de la vida del paciente. Por lo tanto, cobra vital importancia identificar y validar nuevos biomarcadores de diagnóstico que permitan optimizar la detección del cáncer de próstata, reduciendo al mínimo los estudios invasivos innecesarios; y descubrir indicadores de

riesgo para predecir el curso de la enfermedad con mayor precisión al identificar los tumores con altas probabilidades de progresión.

Teniendo en consideración que hay un incremento en el número de vesículas extracelulares circulantes en pacientes oncológicos, incluidos aquellos con tumores prostáticos^{194,195}, y que los exosomas reflejan la célula de origen y están presentes en los distintos fluidos corporales, estas vesículas se posicionan como potenciales biomarcadores alternativos de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad a partir de métodos poco invasivos como las biopsias líquidas¹⁹⁶. Los resultados de esta tesis demuestran que las vesículas extracelulares en plasma de pacientes con cáncer de próstata presentan un contenido diferencial con respecto a las vesículas en individuos sanos, habiendo identificado un grupo de ARNs exosomales (mRNAs, miRNAs y lncRNAs) que serían buenos candidatos como biomarcadores de diagnóstico poco invasivos. Además, mediante un análisis *in silico*, se encontraron diversos procesos y vías de señalización fundamentales en el tejido óseo que estarían siendo regulados por estos ARNs, por lo que también sería interesante diseñar estrategias para regular sus niveles con el objetivo de impedir o retrasar sus efectos sobre las células de hueso, de manera de impedir el desarrollo de metastásis óseas en el cáncer de próstata. Un antecedente de la utilidad del contenido exosomal como biomarcador de uso clínico es la prueba *ExoDx Prostate IntelliScore* (<http://www.exosomedx.com/prostate-cancer-0>) que analiza tres ARNs contenidos en exosomas urinarios, expresados en tumores prostáticos de grado intermedio/alto (grado de Gleason ≥ 7), y en el año 2019 fue incluido por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos en el programa de dispositivos innovadores, ya que consideró que provee una mejora en el diagnóstico de enfermedades o condiciones con riesgo de vida. Sin embargo, todavía requiere ser validado para ser utilizado en la práctica clínica diaria.

Con el fin de evaluar si los ARNs identificados a partir del estudio del contenido de las vesículas extracelulares de pacientes podrían tener algún tipo de asociación con la progresión de la enfermedad se utilizó el set de datos de TCGA-PRAD, y se pudo determinar que los niveles de expresión en los tejidos tumorales primarios de 4 lncRNAs (*PCBP1-AS1*, *MIR646HG*, *LINC00506* y *LAMA5-AS1*) y 6 mRNAs (*HADHA*, *ANGPT1*, *DLGAP3*, *HASPIN*, *CDHR1* y *CDC26*) se encontraban significativamente asociados a la sobrevida libre de progresión de los pacientes con cáncer de próstata. El análisis de la expresión de genes individuales ya fue ampliamente estudiado y no demostró ser lo suficientemente específico y sensible para poder ser aplicado en la clínica como biomarcador de progresión del cáncer de próstata; por lo tanto, en la actualidad, el principal desafío para aumentar el valor predictivo de los indicadores es construir modelos que integren datos transcriptómicos e información clinicopatológica. Por este motivo, se buscó modelar puntajes de riesgo con los ARNs identificados, demostrando que al evaluarlos conjuntamente con la información histopatológica de grupos ISUP agregaban valor predictivo a este parámetro de referencia. Más aún, al integrar en un mismo modelo el dato de grupo ISUP, el puntaje lncRNAs y el puntaje mRNAs, se obtuvo una mayor capacidad predictiva de la probabilidad de progresión del cáncer de próstata.

A pesar de las ventajas que introdujo la implementación del nuevo sistema de estadificación por grupos ISUP como método de referencia en cáncer de próstata frente al sistema original de puntuación de Gleason, continúa siendo un desafío poder determinar con un alto grado de certeza el pronóstico de los pacientes. En este contexto, el puntaje de riesgo propuesto ofrece la ventaja de poder identificar a pacientes con altas probabilidades de progresión, aunque histopatológicamente sus tumores sean de un grado ISUP bajo/intermedio; pudiendo así modificar la estrategia terapéutica para evitar la evolución de la enfermedad.

Basándonos en la premisa de que las vesículas extracelulares son un reflejo de las células que las originan¹⁹⁷, podría inferirse que los niveles aumentados o disminuidos de estos ARNs candidatos en los tumores primarios de cáncer de próstata también estarían viéndose plasmados en las vesículas extracelulares circulantes de los

pacientes. Sin embargo, para poder comprobar esta hipótesis sería necesario poder contar con estudios mucho más completos que proporcionen datos de los niveles de ARNs en los tumores primarios y en las vesículas extracelulares circulantes, y que además realicen un seguimiento de los pacientes que permita obtener información sobre la evolución clínica de la enfermedad en el tiempo. A la vez, sería de gran utilidad contar con información sobre las características de las metástasis de los pacientes para profundizar el estado de conocimiento sobre los efectos que tienen las vesículas extracelulares derivadas de estos tumores, las biomoléculas que transportan, y su efecto sobre los distintos tipos celulares que constituyen el tejido óseo. Sin embargo, las biopsias de hueso para realizar el estudio de las metástasis óseas es un procedimiento altamente invasivo. Además, el tejido metastásico suele ser de difícil acceso, la cantidad de material obtenido es pequeña y no siempre es de buena calidad; lo que limita mucho los estudios posteriores. Todo esto hace que los riesgos de la biopsia ósea (dolor, fractura, sangrado prolongado, infección) superen en gran medida a los beneficios que puedan obtenerse; razón por la cual la biopsia de hueso es un procedimiento que se realiza de forma excepcional. Por lo tanto, el conocimiento de la biología de las metástasis óseas y las interacciones bioquímicas entre la célula tumoral prostática y la célula ósea hoy se limita a estudios *in vitro* y modelos animales.

En resumen, aún con las limitaciones que se mencionaron sobre la disponibilidad de datos, el análisis realizado permitió identificar un grupo de ARNs con potencial como biomarcadores de diagnóstico de cáncer de próstata mediante biopsias líquidas, que además podrían ser candidatos relevantes para el desarrollo de terapias que los tengan como blancos con la finalidad de prevenir o retrasar el establecimiento de metástasis en hueso. Algunos de ellos, a la vez, mostraron una asociación significativa entre sus niveles de expresión en los tumores primarios y el tiempo de supervivencia libre de progresión de la enfermedad, por lo que se propone estudiar sus niveles de manera conjunta con la información histopatológica que brinda el sistema de referencia propuesto por la ISUP, con el objetivo de determinar empíricamente el riesgo de progresión del cáncer de próstata.

Conclusión

Los resultados de esta tesis permitieron ampliar el conocimiento sobre los efectos de las ELVs derivadas de células tumorales prostáticas sobre células óseas y la influencia que estas podrían tener en la preparación del nicho metastásico en el hueso. Como consecuencia del tratamiento con ELVs derivadas de células PC3, se evidenciaron alteraciones en los perfiles de expresión génica en células precursoras óseas MC3T3 y Raw264.7, y cambios morfológicos en las células pre-osteoclasticas Raw264.7. Asimismo, al analizar el contenido de ARNs de las ELVs de PC3 a partir de datos públicos y de muestras propias, se identificaron ARNs no codificantes que modularían procesos y vías de señalización en sus células receptoras, favoreciendo la progresión del cáncer de próstata.

Adicionalmente, al estudiar el contenido de vesículas extracelulares en circulación de pacientes con cáncer de próstata, se identificaron ARNs con abundancia diferencial en comparación con individuos sanos que tendrían potencial como biomarcadores de diagnóstico mediante biopsias líquidas y también serían capaces de regular procesos de relevancia para el mantenimiento de la homeostasis en células receptoras óseas. Además, se determinó que los niveles de algunos de estos ARNs en los tumores primarios presentan una asociación significativa con el tiempo de supervivencia libre de progresión de la enfermedad y que, al estudiarlos en conjunto con la información histopatológica de grado de ISUP, permitirían optimizar la predicción del riesgo de progresión del cáncer de próstata.

De esta manera, los resultados presentados en esta tesis constituyen las bases para continuar profundizando la investigación sobre el rol de las vesículas extracelulares y los ARNs identificados, que no solo podrían convertirse en nuevos biomarcadores utilizados en la práctica clínica, sino que también podrían ser candidatos interesantes como blancos moleculares de terapias desarrolladas para prevenir o retrasar el establecimiento de las metástasis óseas del cáncer de próstata.

Bibliografía

1. Balk, S. P., Ko, Y.-J. & Bubley, G. J. Biology of prostate-specific antigen. *J. Clin. Oncol.* **21**, 383–391 (2003).
2. National Cancer Institute. Cáncer de próstata. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata/>.
3. Verze, P., Cai, T. & Lorenzetti, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat. Rev. Urol.* **13**, 379–386 (2016).
4. De Marzo, A. M. *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 256–269 (2007).
5. Heinlein, C. A. & Chang, C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr. Rev.* **25**, 276–308 (2004).
6. Rodríguez-López, M. R., Baluja-Conde, I. B. & Bermúdez-Velásquez, S. Patologías benignas de la próstata: prostatitis e hiperplasia benigna. *Rev Biomed* **18**, 47–59 (2007).
7. Global Cancer Observatory. GLOBOCAN 2020. <http://www.gco.iarc.fr/>.
8. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).
9. Abate-Shen, C. & Shen, M. M. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* **14**, 2410–2434 (2000).
10. Rubin, M. A. & Demichelis, F. The Genomics of Prostate Cancer: emerging understanding with technologic advances. *Mod. Pathol.* **31**, (2018).
11. Montironi, R., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Cheng, L. & Scarpelli, M. Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **4**, 321–332 (2007).
12. Udensi, U. K. & Tchounwou, P. B. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 139 (2016).
13. Dayyani, F., Gallick, G. E., Logothetis, C. J. & Corn, P. G. Novel therapies for metastatic castrate-resistant prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 1665–1675 (2011).
14. Witte, J. S. Prostate cancer genomics: towards a new understanding. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 77–82 (2009).
15. Loeb, S. Biomarkers for Prostate Biopsy and Risk Stratification of Newly Diagnosed Prostate Cancer Patients. *Urol. Pract.* **4**, 315–321 (2017).
16. Filella, X. *et al.* PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. *Tumour Biol.* **34**, 1337–1347 (2013).
17. Gleason, D. F., Mellinger, G. T. & Arding, L. J. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.* **111**, 58–64 (1974).
18. Foundation, P. C. Diagnosis & Staging of Prostate Cancer. <https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/diagnosis-staging-prostate-cancer/>.
19. Epstein, J. I. *et al.* The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 244–252 (2016).
20. Wilt, T. J. *et al.* Radical Prostatectomy or Observation for Clinically Localized Prostate Cancer: Extended Follow-up of the Prostate Cancer Intervention Versus Observation Trial (PIVOT). *Eur. Urol.* **77**, 713–724 (2020).
21. Klotz, L. Active surveillance in intermediate-risk prostate cancer. *BJU Int.* **125**, 346–354 (2020).
22. American Cancer Society. Prostate Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer.html>.

23. Buyyounouski, M. K. *et al.* Prostate cancer – major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 245–253 (2017).
24. Downey, P. A. & Siegel, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys. Ther.* **86**, 77–91 (2006).
25. Robling, A. G., Castillo, A. B. & Turner, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 455–498 (2006).
26. Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. & Varanasi, S. S. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.* **61**, 577–587 (2008).
27. Boskey, A. L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep.* **2**, (2013).
28. Alford, A. I., Kozloff, K. M. & Hankenson, K. D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **65**, 20–31 (2015).
29. Boskey, A. L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S. B. & McKee, M. D. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif. Tissue Int.* **71**, 145–154 (2002).
30. Aszódi, A., Bateman, J. F., Gustafsson, E., Boot-Handford, R. & Fässler, R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Struct. Funct.* **25**, 73–84 (2000).
31. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
32. Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N. M. & Aubin, J. E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* **106**, 2139–2151 (1988).
33. Roodman, G. D. Mechanisms of bone metastasis. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1655–1664 (2004).
34. Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* **561**, 3–12 (2014).
35. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 747–754 (1997).
36. Komori, T. *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).
37. M, F., E, H., B, B., R, B. & D, M. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J. Stem Cells* **5**, 136 (2013).
38. Dallas, S. L. & Bonewald, L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 437–443 (2010).
39. Suda, T., Takahashi, N. & Martin, T. J. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* **13**, 66–80 (1992).
40. Boyce, B. F., Hughes, D. E., Wright, K. R., Xing, L. & Dai, A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab. Invest.* **79**, 83–94 (1999).
41. Boyce, B. F. Advances in osteoclast biology reveal potential new drug targets and new roles for osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* **28**, 711–722 (2013).
42. Crockett, J. C., Mellis, D. J., Scott, D. I. & Helfrich, M. H. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos. Int.* **22**, 1–20 (2011).
43. Arana-Chavez, V. E. & Bradaschia-Correa, V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 446–450 (2009).
44. Väänänen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. & Halleen, J. M. The cell biology of osteoclast function. *J. Cell*

Sci. **113 (Pt 3)**, 377–381 (2000).

45. Yavropoulou, M. P. & Yovos, J. G. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **8**, 204–216 (2008).
46. Glass, D. A. & Karsenty, G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* **148**, 2630–2634 (2007).
47. Sodek, J. & McKee, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol. 2000* **24**, 99–126 (2000).
48. Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M. & Xu, J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin. Biochem.* **45**, 863–873 (2012).
49. Boyce, B. F. & Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 139 (2008).
50. Longhini, R., de Oliveira, P. A., de Souza Faloni, A. P., Sasso-Cerri, E. & Cerri, P. S. Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. *J. Anat.* **222**, 239–247 (2013).
51. Longhini, R., Aparecida de Oliveira, P., Sasso-Cerri, E. & Cerri, P. S. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J. Periodontol.* **85**, 1115–1125 (2014).
52. Weilbaecher, K. N., Guise, T. A. & McCauley, L. K. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat. Rev. Cancer* **2011 116** **11**, 411–425 (2011).
53. Bonewald, L. F. The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 229–238 (2011).
54. Hauge, E. M., Qvesel, D., Eriksen, E. F., Mosekilde, L. & Melsen, F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1575–1582 (2001).
55. Pettit, A. R., Chang, M. K., Hume, D. A. & Raggatt, L. J. Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Bone* **43**, 976–982 (2008).
56. Cho, S. W. Role of osteal macrophages in bone metabolism. *J. Pathol. Transl. Med.* **49**, 102–104 (2015).
57. Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **331**, 1559–1564 (2011).
58. Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B. & Männel, D. N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* **59**, 1295–1300 (1999).
59. Baldessari, C. *et al.* Bone Metastases and Health in Prostate Cancer: From Pathophysiology to Clinical Implications. *Cancers (Basel)*. **15**, (2023).
60. Zhang, X. Interactions between cancer cells and bone microenvironment promote bone metastasis in prostate cancer. *Cancer Commun.* **2019 391** **39**, 1–10 (2019).
61. Shah, R. B. *et al.* Androgen-independent prostate cancer is a heterogeneous group of diseases: lessons from a rapid autopsy program. *Cancer Res.* **64**, 9209–9216 (2004).
62. James, N. D. *et al.* Survival with Newly Diagnosed Metastatic Prostate Cancer in the ‘Docetaxel Era’: Data from 917 Patients in the Control Arm of the STAMPEDE Trial (MRC PR08, CRUK/06/019). *Eur. Urol.* **67**, 1028–1038 (2015).
63. Halabi, S. *et al.* Meta-Analysis Evaluating the Impact of Site of Metastasis on Overall Survival in Men With Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 1652–1659 (2016).
64. Wang, M., Xia, F., Wei, Y. & Wei, X. Molecular mechanisms and clinical management of cancer bone metastasis. *Bone Res.* **8**, (2020).
65. Fang, J. & Xu, Q. Differences of osteoblastic bone metastases and osteolytic bone metastases in

- clinical features and molecular characteristics. *Clin. Transl. Oncol.* **17**, 173–179 (2015).
66. Logothetis, C. J. & Lin, S. H. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 21–28 (2005).
 67. Yano, S. *et al.* Calcium-sensing receptor activation stimulates parathyroid hormone-related protein secretion in prostate cancer cells: Role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Bone* **35**, 664–672 (2004).
 68. Berish, R. B., Ali, A. N., Telmer, P. G., Ronald, J. A. & Leong, H. S. Translational models of prostate cancer bone metastasis. *Nat. Rev. Urol.* **15**, 403–421 (2018).
 69. Berish, R. B., Ali, A. N., Telmer, P. G., Ronald, J. A. & Leong, H. S. Translational models of prostate cancer bone metastasis. *Nat. Rev. Urol.* **2018** *157* **15**, 403–421 (2018).
 70. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* **262**, 9412–9420 (1987).
 71. Van Niel, G., D’Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228 (2018).
 72. Chen, Y. & Yu, L. Extracellular vesicles: from bench to bedside. *Curr. Med.* **2022** *11* **1**, 1–12 (2022).
 73. Colombo, M. *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **126**, 5553–5565 (2013).
 74. Perez-Hernandez, D. *et al.* The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* **288**, 11649–11661 (2013).
 75. Grange, C. & Bussolati, B. Extracellular vesicles in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2022** *188* **18**, 499–513 (2022).
 76. Matsumoto, A. *et al.* Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer Sci.* **108**, 1803–1810 (2017).
 77. Buzás, E. I., Tóth, E., Sódar, B. W. & Szabó-Taylor, K. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Semin. Immunopathol.* **40**, 453–464 (2018).
 78. Zhang, W. *et al.* ICAM-1-mediated adhesion is a prerequisite for exosome-induced T cell suppression. *Dev. Cell* **57**, 329–343.e7 (2022).
 79. Morelli, A. E. *et al.* Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* **104**, 3257–3266 (2004).
 80. Sung, B. H., Ketova, T., Hoshino, D., Zijlstra, A. & Weaver, A. M. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat. Commun.* **2015** *61* **6**, 1–14 (2015).
 81. Purushothaman, A. *et al.* Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *J. Biol. Chem.* **291**, 1652–1663 (2016).
 82. Nazarenko, I. *et al.* Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res.* **70**, 1668–1678 (2010).
 83. Rana, S., Claas, C., Kretz, C. C., Nazarenko, I. & Zoeller, M. Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 106–119 (2011).
 84. Théry, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. vesicles* **7**, (2018).
 85. Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. & Tang, W. H. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential.

Cell Biosci. 2019 91 **9**, 1–18 (2019).

86. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavie, G. & Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **21**, 9–17 (2019).
87. Mashouri, L. *et al.* Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol. Cancer* **18**, (2019).
88. Skotland, T., Hessvik, N. P., Sandvig, K. & Llorente, A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J. Lipid Res.* **60**, 9–18 (2019).
89. Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L. & Baruteau, J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun. Signal.* 2021 191 **19**, 1–19 (2021).
90. Dragomir, M. P., Kopetz, S., Ajani, J. A. & Calin, G. A. Non-coding RNAs in GI cancers: from cancer hallmarks to clinical utility. *Gut* **69**, 748–763 (2020).
91. Quinn, J. J. & Chang, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 47–62 (2016).
92. Valencia, K. & Montuenga, L. M. Exosomes in Liquid Biopsy: The Nanometric World in the Pursuit of Precision Oncology. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 2147 **13**, 2147 (2021).
93. Corrado, C. *et al.* Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 5338–5366 (2013).
94. Atay, S. & Godwin, A. K. Tumor-derived exosomes: A message delivery system for tumor progression. *Commun. Integr. Biol.* **7**, (2014).
95. Valencia, K. *et al.* miRNA cargo within exosome-like vesicle transfer influences metastatic bone colonization. *Mol. Oncol.* **8**, 689 (2014).
96. Zhou, W. *et al.* Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* **25**, 501 (2014).
97. Umez, T., Ohnishi, K., Kuroda, M. & Ohnishi, J. H. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene* **32**, 2747–2755 (2013).
98. Rao, Q. *et al.* Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro. *Hepatology* **64**, 456–472 (2016).
99. Guo, J. *et al.* Mouse 4T1 Breast Cancer Cell-Derived Exosomes Induce Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages via miR-183. *J. Immunol.* **205**, 2916–2925 (2020).
100. Zhou, C. *et al.* Cancer-secreted exosomal miR-1468-5p promotes tumor immune escape via the immunosuppressive reprogramming of lymphatic vessels. *Mol. Ther.* **29**, 1512–1528 (2021).
101. Yuan, Y. *et al.* Exosomal O-GlcNAc transferase from esophageal carcinoma stem cell promotes cancer immunosuppression through up-regulation of PD-1 in CD8+ T cells. *Cancer Lett.* **500**, 98–106 (2021).
102. Morrissey, S. M. *et al.* Tumor-derived exosomes drive immunosuppressive macrophages in a pre-metastatic niche through glycolytic dominant metabolic reprogramming. *Cell Metab.* **33**, 2040-2058.e10 (2021).
103. Bhatia, R., Chang, J., Munoz, J. L. & Walker, N. D. Forging New Therapeutic Targets: Efforts of Tumor Derived Exosomes to Prepare the Pre-Metastatic Niche for Cancer Cell Dissemination and Dormancy. *Biomedicines* **11**, 1614 (2023).
104. Wang, M. *et al.* Tumor-derived exosomes drive pre-metastatic niche formation in lung via modulating CCL1+ fibroblast and CCR8+ Treg cell interactions. *Cancer Immunol. Immunother.* **71**, 2717–2730 (2022).
105. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nat.* 2015 5277578

527, 329–335 (2015).

106. Zhang, H. *et al.* Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis. *Nat. Commun.* 2017 **8**, 1–11 (2017).
107. Wang, L. *et al.* CD103-positive CSC exosome promotes EMT of clear cell renal cell carcinoma: Role of remote MiR-19b-3p. *Mol. Cancer* **18**, 1–15 (2019).
108. Zhao, L., Ma, X. & Yu, J. Exosomes and organ-specific metastasis. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **22**, 133–147 (2021).
109. Blackwell, R. H., Foreman, K. E. & Gupta, G. N. The Role of Cancer-Derived Exosomes in Tumorigenicity & Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancers (Basel)*. **9**, (2017).
110. Kim, H. *et al.* The Emerging Roles of Exosomes as EMT Regulators in Cancer. *Cells* **9**, (2020).
111. Jiang, J. *et al.* Exosomes Regulate the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Front. Oncol.* **12**, (2022).
112. Xu, M. *et al.* Tumor associated macrophages-derived exosomes facilitate hepatocellular carcinoma malignance by transferring IncMMPA to tumor cells and activating glycolysis pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **41**, (2022).
113. Hu, Y. *et al.* Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLoS One* **10**, (2015).
114. Vallabhaneni, K. C. *et al.* Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Stress Increase Osteosarcoma Migration and Apoptosis Resistance via Extracellular Vesicle Mediated Communication. *PLoS One* **11**, (2016).
115. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science* **367**, (2020).
116. Naito, Y., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y. & Ochiya, T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 697 (2017).
117. Vlaeminck-Guillem, V. Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis, Diagnosis, and Management. *Front. Oncol.* **8**, (2018).
118. Lorenc, T. *et al.* Exosomes in Prostate Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–14 (2020).
119. Ramteke, A. *et al.* Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol. Carcinog.* **54**, 554–565 (2015).
120. Deep, G. *et al.* Exosomes secreted by prostate cancer cells under hypoxia promote matrix metalloproteinases activity at pre-metastatic niches. *Mol. Carcinog.* **59**, 323–332 (2020).
121. Dai, J. *et al.* Primary prostate cancer educates bone stroma through exosomal pyruvate kinase M2 to promote bone metastasis. *J. Exp. Med.* **216**, 2883–2899 (2019).
122. Borel, M. *et al.* Prostate cancer-derived exosomes promote osteoblast differentiation and activity through phospholipase D2. *Biochim. Biophys. acta. Mol. basis Dis.* **1866**, (2020).
123. Ma, Q. *et al.* Small extracellular vesicles deliver osteolytic effectors and mediate cancer-induced osteolysis in bone metastatic niche. *J. Extracell. vesicles* **10**, (2021).
124. Yu, L. *et al.* Exosomes derived from osteogenic tumor activate osteoclast differentiation and concurrently inhibit osteogenesis by transferring COL1A1-targeting miRNA-92a-1-5p. *J. Extracell. Vesicles* **10**, (2021).
125. Lundholm, M. *et al.* Prostate Tumor-Derived Exosomes Down-Regulate NKG2D Expression on Natural Killer Cells and CD8+ T Cells: Mechanism of Immune Evasion. *PLoS One* **9**, (2014).
126. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. & Jones, L. W. Establishment and

- characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17**, 16–23 (1979).
127. Wang, D. *et al.* Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 893–903 (1999).
 128. Walker, J. M. *Bone Research Protocols*. (Humana Press, 2012).
 129. Shelke, G. V., Lässer, C., Gho, Y. S. & Lötval, J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J. Extracell. vesicles* **3**, (2014).
 130. Robinson, H. *et al.* Caveolin-1-driven membrane remodelling regulates hnRNPK-mediated exosomal microRNA sorting in cancer. *Clin. Transl. Med.* **11**, (2021).
 131. Probert, C. *et al.* Communication of prostate cancer cells with bone cells via extracellular vesicle RNA; a potential mechanism of metastasis. *Oncogene* **38**, 1751–1763 (2019).
 132. Hessvik, N. P., Phuyal, S., Brech, A., Sandvig, K. & Llorente, A. Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 1154–1163 (2012).
 133. Hulsen, T. DeepVenn -- a web application for the creation of area-proportional Venn diagrams using the deep learning framework Tensorflow.js. (2022) doi:10.48550/arxiv.2210.04597.
 134. Li, J. *et al.* TAM 2.0: tool for MicroRNA set analysis. *Nucleic Acids Res.* **46**, W180 (2018).
 135. Chang, L., Zhou, G., Soufan, O. & Xia, J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res.* **48**, W244–W251 (2020).
 136. Sherman, B. T. *et al.* DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* **50**, W216–W221 (2022).
 137. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
 138. Package ‘genefilter’ Title genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments Description Some basic functions for filtering genes. (2023).
 139. Seal, R. L. *et al.* Genenames.org: the HGNC resources in 2023. *Nucleic Acids Res.* **51**, D1003–D1009 (2023).
 140. Li, J. H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L. H. & Yang, J. H. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
 141. Yuan, T. *et al.* Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 142. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 1–21 (2014).
 143. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
 144. Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J. & Jensen, L. J. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J. Proteome Res.* **18**, 623–632 (2019).
 145. Goldman, M. J. *et al.* Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat. Biotechnol.* **38**, 675–678 (2020).
 146. Liu, J. *et al.* An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell* **173**, 400–416.e11 (2018).
 147. Budczies, J. *et al.* Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* **7**, (2012).
 148. Baker, S. G. The central role of receiver operating characteristic (ROC) curves in evaluating tests for the early detection of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 511–515 (2003).

149. Tibshirani, R. J. Univariate shrinkage in the cox model for high dimensional data. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **8**, (2009).
150. Bueno-Fortes, S., Berral-Gonzalez, A., Sánchez-Santos, J. D. S. M., Martin-Merino, M. & De Las Rivas, J. Identification of a gene expression signature associated with breast cancer survival and risk that improves clinical genomic platforms. *Bioinforma. Adv.* **3**, (2023).
151. Ferrando, M. *et al.* Heme oxygenase-1 (HO-1) expression in prostate cancer cells modulates the oxidative response in bone cells. *PLoS One* **8**, e80315 (2013).
152. Paez, A. V *et al.* Heme oxygenase-1 in the forefront of a multi-molecular network that governs cell-cell contacts and filopodia-induced zippering in prostate cancer. *Cell Death Dis.* **7**, e2570 (2016).
153. Anselmino, N. *et al.* HO-1 interactors involved in the colonization of the bone niche: Role of ANXA2 in prostate cancer progression. *Biomolecules* **10**, (2020).
154. Anselmino, N. *et al.* Heme Oxygenase-1 Is a Pivotal Modulator of Bone Turnover and Remodeling: Molecular Implications for Prostate Cancer Bone Metastasis. *Antioxidants Redox Signal.* **32**, 1243–1258 (2020).
155. Xiao, Y. *et al.* A novel significance score for gene selection and ranking. *Bioinformatics* **30**, 801–807 (2014).
156. Jin, J. K., Dayyani, F. & Gallick, G. E. Steps in Prostate Cancer Progression that lead to Bone Metastasis. *Int. J. Cancer* **128**, 2545 (2011).
157. Gueron, G., De Siervi, A. & Vazquez, E. Advanced prostate cancer: Reinforcing the strings between inflammation and the metastatic behavior. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* vol. 15 213–221 (2012).
158. Lancet, S. P.-T. & 1889, undefined. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *integrative-cancer-care.org*.
159. Akhtar, M., Haider, A., Rashid, S. & Al-Nabet, A. D. M. H. Paget's 'Seed and Soil' Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv. Anat. Pathol.* **26**, 69–74 (2019).
160. Sanchis, P. *et al.* Bone Progenitors Pull the Strings on the Early Metabolic Rewiring Occurring in Prostate Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. **14**, (2022).
161. Fizazi, K. *et al.* Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2587–2597 (2003).
162. Zhang, J. *et al.* Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **13**, 17 (2015).
163. Park, J. E. *et al.* Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. *Mol. Cell. Proteomics* (2010) doi:10.1074/mcp.M900381-MCP200.
164. Clayton, A., Turkes, A., Navabi, H., Mason, M. & Tabi, Z. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J. Cell Sci.* (2005).
165. de Jong, O. G. *et al.* Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J. Extracell. Vesicles* (2012) doi:10.3402/jev.v1i0.18396.
166. Soekmadji, C. *et al.* Extracellular vesicles for personalized therapy decision support in advanced metastatic cancers and its potential impact for prostate cancer. *Prostate* **77**, 1416–1423 (2017).
167. Pan, J., Ding, M., Xu, K., Yang, C. & Mao, L. Exosomes in diagnosis and therapy of prostate cancer. *Oncotarget* (2017) doi:10.18632/oncotarget.18532.
168. Karlsson, T., Lundholm, M., Widmark, A. & Persson, E. Tumor cell-derived exosomes from the

- prostate cancer cell line TRAMP-C1 impair osteoclast formation and differentiation. *PLoS One* (2016) doi:10.1371/journal.pone.0166284.
169. Chowdhury, R. *et al.* Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget* (2015) doi:10.18632/oncotarget.2711.
 170. Sugatani, T., Vacher, J. & Hruska, K. A. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood* (2011) doi:10.1182/blood-2010-10-311415.
 171. Zhang, H. L. *et al.* An elevated serum miR-141 level in patients with bone-metastatic prostate cancer is correlated with more bone lesions. *Asian J. Androl.* (2013) doi:10.1038/aja.2012.116.
 172. Li, S. L. *et al.* Exosomes from LNCaP cells promote osteoblast activity through miR-375 transfer. *Oncol. Lett.* **17**, 4463–4473 (2019).
 173. Duan, Y. *et al.* PC-3-Derived Exosomes Inhibit Osteoclast Differentiation by Downregulating miR-214 and Blocking NF- κ B Signaling Pathway. *Biomed Res. Int.* **2019**, (2019).
 174. Ueta, M. *et al.* Effects of TGF- β 1 on the migration and morphology of RAW264.7 cells in vitro. *Mol. Med. Rep.* **20**, 4331–4339 (2019).
 175. Lampiasi, N. *et al.* Osteoclasts Differentiation from Murine RAW 264.7 Cells Stimulated by RANKL: Timing and Behavior. *Biol. 2021, Vol. 10, Page 117* **10**, 117 (2021).
 176. Silvestris, F., D’Oronzo, S., Lovero, D., Palmirotta, R. & Dammacco, F. Bone Metastases from Solid Tumors: In Search of Predictive Biomarkers for Clinical Translation. *Oncogenomics From Basic Res. to Precis. Med.* 141–163 (2019) doi:10.1016/B978-0-12-811785-9.00010-7.
 177. Mundy, G. R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 584–593 (2002).
 178. Joseph, J. *et al.* Disseminated prostate cancer cells can instruct hematopoietic stem and progenitor cells to regulate bone phenotype. *Mol. Cancer Res.* **10**, 282–292 (2012).
 179. Roux, S. & Orcel, P. Bone loss: Factors that regulate osteoclast differentiation - an update. *Arthritis Res.* **2**, 451 (2000).
 180. Papadopoulou, A., Bountouvi, E. & Karachaliou, F. E. The Molecular Basis of Calcium and Phosphorus Inherited Metabolic Disorders. *Genes (Basel).* **12**, (2021).
 181. Dai, Z. & Koh, W. P. B-vitamins and bone health--a review of the current evidence. *Nutrients* **7**, 3322–3346 (2015).
 182. Ponzetti, M. & Rucci, N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 183. Kuhn, M. R. *et al.* Myeloid cell-derived catecholamines influence bone turnover and regeneration in mice. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **13**, (2022).
 184. Hanns, P., Paczulla, A. M., Medinger, M., Konantz, M. & Lengerke, C. Stress and catecholamines modulate the bone marrow microenvironment to promote tumorigenesis. *Cell Stress* **3**, 221 (2019).
 185. Tschaffon-Müller, M. E. A. *et al.* Neutrophil-derived catecholamines mediate negative stress effects on bone. *Nat. Commun.* **2023 141** **14**, 1–15 (2023).
 186. Adekoya, T. O. & Richardson, R. M. Cytokines and Chemokines as Mediators of Prostate Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–29 (2020).
 187. Jiang, S., Chen, H., He, K. & Wang, J. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes attenuated prostate cancer progression via the miR-99b-5p/IGF1R axis. *Bioengineered* **13**, 2004 (2022).
 188. Liu, J. *et al.* Bone-derived exosomes. *Curr. Opin. Pharmacol.* **34**, 64–69 (2017).
 189. Zhang, X. *et al.* Hypoxic BMSC-derived exosomal miRNAs promote metastasis of lung cancer cells via

STAT3-induced EMT. *Mol. Cancer* **18**, 1–15 (2019).

190. Nishimori, H., Ehata, S., Suzuki, H. I., Katsuno, Y. & Miyazono, K. Prostate Cancer Cells and Bone Stromal Cells Mutually Interact with Each Other through Bone Morphogenetic Protein-mediated Signals. *J. Biol. Chem.* **287**, 20037 (2012).
191. Lowery, J. W. & Rosen, V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol. Rev.* **98**, 2431–2452 (2018).
192. Leonardi, D. B. *et al.* Heme Oxygenase 1 Impairs Glucocorticoid Receptor Activity in Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, Page 1006 **20**, 1006 (2019).
193. Ministerio de Salud de la Nación. Cáncer de próstata.
<https://www.argentina.gob.ar/salud/cancer/tipos/cancer-de-prostata>.
194. Valentino, A. *et al.* Exosomal microRNAs in liquid biopsies: future biomarkers for prostate cancer. *Clinical and Translational Oncology* (2017) doi:10.1007/s12094-016-1599-5.
195. Foj, L. *et al.* Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. *Prostate* (2017) doi:10.1002/pros.23295.
196. Yu, D. *et al.* Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol. Cancer* **21**, 1–33 (2022).
197. Rajagopal, C. & Harikumar, K. B. The origin and functions of exosomes in cancer. *Front. Oncol.* **8**, 66 (2018).