



ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Antonio Altuna Coy

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

ANTONIO ALTUNA COY

-
- Fn14
 - sTWEAK
 - mTWEAK
 - Macrófagos
 - Cáncer de Próstata
 - Vesículas Extracelulares

TESIS DOCTORAL
2022

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Antonio Altuna Coy

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Antonio Altuna Coy

Antonio Altuna Coy

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

TESIS DOCTORAL

Dirigida por

Dra. Matilde Rodríguez Chacón y Dr. Xavier Ruiz Plazas



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

Tarragona, 2022

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA
Antonio Altuna Coy



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departamento de Ciencias Médicas Básicas

C/ Sant Llorenç, 21
43203 – Reus (Tarragona)
Teléfono: 977759305
Fax: 977759322

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat “**Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata**”, que presenta **Antonio Altuna Coy** per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de **Medicina y Cirurgia** d’aquesta universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado “**Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata**”, que presenta **Antonio Altuna Coy** para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de **Medicina y Cirugía** de esta universidad.

I STATE that the present study, entitled “**Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata**”, presented by **Antonio Altuna Coy** for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department of **Medicine and Surgery** of this university.

En Tarragona, a 26 de agosto de 2022

El/s director/s de la tesi doctoral
El/los director/es de la tesis doctoral
Doctoral Thesis Supervisor/s

Firmado por RODRIGUEZ CHACON,
MATILDE (FIRMA) el día
29/08/2022 con un certificado
emitido por AC DNIE 005

Dra. Matilde Rodríguez Chacón

Xavier Ruiz
Plazas /
num:4305035

Signat digitalment per Xavier Ruiz Plazas /
num:4305035
DN: c=ES, st=Reus, o=Col·legi Oficial de
Metges de Tarragona / COMT / 0008,
ou=Colegiado, title=Urologia, sn=Ruiz Plazas,
givenName=Xavier,
serialNumber=39905541N, cn=Xavier Ruiz
Plazas / num:4305035,
email=xarupl@gmail.com
Data: 2022.08.29 11:20:11 +0200

Dr. Xavier Ruiz Plazas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA
Antonio Altuna Coy

“Tus sueños tomarán tiempo. Requerirán esfuerzo, dedicación y sacrificio. Pero al final valdrá la pena”

R. A Prakash

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA
Antonio Altuna Coy

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral es el reflejo de la ardua investigación realizada, no solo durante el periodo predoctoral, sino desde que empecé mi etapa universitaria. Puede sonar egocéntrico, sin embargo, no hubiera llegado a buen puerto sin la ayuda indispensable de todas las personas que han estado a mi lado durante esta etapa. Es por ello que quiero utilizar el espacio que me permite la tesis para agradecerles el apoyo recibido.

En primer lugar, quiero agradecer a mi supervisora de la tesis, la Dra. Matilde Rodríguez Chacón por todo el apoyo que he recibido y por brindarme su confianza desde las prácticas de grado hasta la realización de la tesis doctoral. También quiero agradecer que estuviera encima de mí desde el primer momento para enseñarme lo bueno y lo malo de la investigación. Gracias por aguantar mis ralladas, bajones de ánimo y por los consejos que me has dado. Todo lo que he aprendido como investigador es gracias a ti y lo pondré en práctica vaya donde vaya. Y agradezco también al Dr. Xavier Ruiz Plazas su dedicación en la investigación en el cáncer de próstata desde el Servicio de Urología del Hospital Joan XXIII de Tarragona y que, sin su implicación en la investigación, no hubiéramos podido hallar biomarcadores que en un futuro ayuden a pronosticar la agresividad del cáncer de próstata.

En segundo lugar, quiero agradecer a mi compañera en el último año de doctorado, Silvia. Has estado escuchándome y dándome consejos de cómo poder afrontar estos últimos meses. No te sientas insegura y cree en ti. Tendrás una tesis impecable. Y recuerda siempre: “*Sencillita, tranquilita, respira...*”.

No menos importante tengo que agradecer a mis otras compañeras de doctorado: Laia, Jen y Ester. Empezamos a la vez y nos hemos escuchado en los buenos y en los malos momentos. Puede ser que “*a veces nos estresemos*”, pero disfrutamos de la investigación que hacemos. Os queda un último empujón en vuestras tesis para convertirnos en grandes doctoras.

Mis amigos han tenido un papel relevante durante esta etapa. Me han ayudado a evadirme y no pensar en el esfuerzo que conlleva la realización de una tesis doctoral. Me han ayudado a divertirme y poder separar la tesis de mi vida personal. ¡Gracias por todo!

Gracias a mi familia por estar cerca de mí dándome todo su cariño y apoyo. Sin vuestro esfuerzo para sacar adelante a 3 hijos, brindándoles la mejor educación posible, no hubiera llegado a este punto de mi vida.

Y, por último, a mi compañero de viaje en estos años, Joan. Quiero darte las gracias por soportar mis refunfuños, mis preocupaciones y mis preparaciones para las divulgaciones que he hecho durante la tesis. Gracias por confiar en mí en todo momento.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA
Antonio Altuna Coy

ÍNDICE

RESUMEN.....	15
ÍNDICE DE FIGURAS.....	20
ÍNDICE DE TABLAS	21
ABREVIACIONES	23
INTRODUCCIÓN.....	27
1. CÁNCER DE PRÓSTATA (CaP)	27
1.1 Anatomía de la próstata	27
1.2. Epidemiología	27
1.2.1 Incidencia y Factores de riesgo	27
1.2.2 Diagnóstico del CaP	27
1.2.2.1 Antígeno Prostático Sérico (PSA).....	28
1.2.2.3 Gleason Score	29
1.2.2.4 Clasificación D'Amico	30
1.2.3 Tratamiento.....	33
1.2.4 Modelos in vitro e in vivo para el estudio del CaP	34
1.3 Inflamación y CaP	36
1.4 Reprogramación metabólica en el CaP	37
1.4.1 Metabolismo lipídico en el CaP.	38
1.4.1.1 Lipogénesis	39
1.4.1.2 Lipólisis	40
2. TUMOR NECROSIS FACTOR-LIKE WEAK INDUCER OF APOPTOSIS (TWEAK)	42
2.1 Estructura	42
2.2 Expresión	42
2.3 Receptores de TWEAK.....	43
2.3.1 Fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14)	43
2.3.2 Cluster de Diferenciación 163 (CD163).....	45
2.4 Señalización de TWEAK y su relación con el cáncer	46
2.4.1 NF-κB canónica.....	47
2.4.2 NF-κB no canónica	48
2.4.3 Vía de señalización de las MAPKs.....	48
2.4.4 Activación de AKT en cáncer	50
2.5 Actividades biológicas de la unión de TWEAK a Fn14	50
2.5.1 Apoptosis	50
2.5.2 Inflamación	51
2.5.3 Diferenciación y adhesión	51
2.5.4 Proliferación y Migración	52
2.5.5 Angiogénesis	52
2.6 El eje TWEAK-Fn14 como posible diana terapéutica	53
2.7 Niveles circulantes de TWEAK y sus receptores como posibles biomarcadores en diferentes patologías	54
3. VESÍCULAS EXTRACELULARES Y EXO-MICRORNAS	56
3.1 Biogénesis, transporte, secreción e internalización de VEs	58
3.1.1 Biogénesis	58
3.1.2 Transporte.....	58
3.1.3 Secreción.....	58
3.1.3.1 Estímulos secretores	59
3.1.4 Internalización	61
3.2 Composición de las VEs.....	62
3.2.1 Proteínas	62

Índice

Estudio del eje TWEAK/Fn14, y de su efecto celular y metabólico, en el microambiente del Cáncer de Próstata

3.2.2 Lípidos	63
3.2.3. Ácidos Nucleicos	63
3.3 <i>miRNAs</i> exosomales.	65
3.3.1 Biogénesis de los <i>miRNAs</i>	65
3.3.2 Empaquetamiento de los <i>microRNAs</i>	66
3.3.3 Herramientas de predicción de dianas de <i>miRNAs</i>	67
3.4 <i>MicroRNAs</i> encapsulados en <i>VEs</i> (<i>Exo-miRNAs</i>) y cáncer	69
3.5 <i>MicroRNAs</i> exosomales como herramienta de diagnóstico y pronóstico del cáncer	72
3.6 <i>Exo-miRNAs</i> en <i>CaP</i>	74
3.7 Abordaje terapéutico y perspectiva en el futuro de los <i>exo-miRNAs</i> en cáncer	76
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	80
RESULTADOS	83
<i>Serum Levels of the Cytokine TWEAK Are Associated with Metabolic Status in Patients with Prostate Cancer and Modulate Cancer Cell Lipid Metabolism in Vitro</i>	<i>84</i>
<i>Liquid Biopsy-Based Exo-oncomiRNAs Can Predict Prostate Cancer Aggressiveness.....</i>	<i>111</i>
DISCUSIÓN	140
<i>TWEAK en el contexto inflamatorio del CaP. Efecto sobre el metabolismo celular.....</i>	<i>140</i>
<i>Efecto de sTWEAK sobre la secreción de VEs en el microambiente del CaP. Utilidad de exomiRNAs como biomarcadores de pronóstico.....</i>	<i>145</i>
CONCLUSIONES	152
BIBLIOGRAFÍA.....	154
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DURANTE LA TESIS DOCTORAL	176

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA
Antonio Altuna Coy

RESUMEN

Justificación

El principal problema en el tratamiento del CaP es la incapacidad de distinguir entre tumores de crecimiento lento y tumores que suponen un riesgo vital para el paciente. La universalización del uso de los niveles de PSA en sangre como prueba de cribado para el diagnóstico de CaP en los años 90 ha permitido una disminución significativa de la mortalidad, pero ha conllevado sobrediagnósticos que comportan sobretratamientos en los pacientes que se verán afectados por efectos secundarios (incontinencia urinaria, disfunción eréctil, síntomas del tracto urinario inferior, problemas digestivos, etc.) sin recibir a cambio un aumento de la supervivencia relacionada con el tratamiento. Por lo tanto, se requieren nuevos biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico más robustos relacionados con procesos patológicos del CaP para identificar tumores agresivos que ponen en riesgo la vida del paciente.

Diferentes citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento pueden promover la modulación de procesos celulares relacionados con el desarrollo tumoral como la apoptosis, el metabolismo o el ciclo celular, entre otros. Además, pueden desencadenar la secreción de vesículas extracelulares (VEs) involucradas en la tumorigénesis, particularmente exosomas puesto que son las vesículas de mayor contenido (carga) en ácidos nucleicos en el microambiente tumoral. Unos de los componentes del cargo más estudiados han sido los microRNAs (miRNAs), que constituyen entre el 30% y el 45% de cargo total de ARN encapsulado, siendo las moléculas de ARN de pequeño tamaño más abundantes en las VEs. Los miRNAs son monocatenarios, de una longitud de entre 17 y 25 nucleótidos, que tienen la capacidad de regular negativamente la expresión de genes diana. Además, los miRNAs encapsulados en las VEs (exomiRNAs) son muy estables en los biofluidos celulares lo que los convierte en excelentes biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico en diferentes patologías, incluido el cáncer.

La transformación maligna de las células requiere adaptaciones metabólicas para satisfacer la energía necesaria para su mayor tasa de proliferación. La desregulación del metabolismo de los lípidos ha sido un sello distintivo del fenotipo maligno en el CaP.

Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK) es una citocina inflamatoria que se localiza en la superficie celular mayoritariamente en macrófagos/monocitos y puede ser liberada a la circulación por un proceso proteolítico (sTWEAK). La presencia de esta citocina en diversos microambientes tumorales puede provocar inflamación y procesos protumorigénicos (migración, proliferación entre otros) mediante la unión a su receptor *bona fide*, *Fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14)*, formando el eje TWEAK/Fn14. Este eje se ha postulado como

biomarcador en diversas patologías, particularmente en aquellas asociadas a inflamación de bajo grado y en las que el metabolismo tiene un papel relevante, como la diabetes tipo 2, diabetes tipo 1, la obesidad o la esteatosis hepática.

Aunque el papel del eje TWEAK/Fn14 se ha estudiado en algunos tumores, únicamente en cáncer de cabeza y cuello se ha postulado como posible biomarcador de pronóstico y supervivencia. En el contexto del CaP, donde la inflamación es uno de los factores implicados en el desarrollo del tumor, detectamos la presencia de sTWEAK en semen. Observamos niveles reducidos de sTWEAK en este biofluido en pacientes con CaP agresivo respecto a pacientes con CaP indolente. Sin embargo, no existen evidencias sobre la relación de los niveles de sTWEAK y la presencia de CaP.

En el presente trabajo pretendemos estudiar si la citocina TWEAK está relacionada con el desarrollo patológico del CaP y, además, determinar si su presencia en el microambiente tumoral podría inducir la liberación de VEs y si su cargo de exomiRNAs podría ser útil como biomarcadores de pronóstico.

Metodología

Llevamos a cabo 2 estudios retrospectivos.

En el primer estudio, se realizó un estudio de casos-controles. Se cuantificaron los niveles en suero de sTWEAK mediante la técnica de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) en una cohorte compuesta por 76 pacientes con CaP (sometidos a prostatectomía radical entre 2015 y 2020 en el Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona) y 159 controles sanos (pacientes con niveles de PSA por debajo del promedio para su edad (<1,3 ng/mL entre 60–69 años y <1,7 ng/mL entre 70–79 años). Se determinó el efecto de TWEAK sobre el metabolismo glucídico y lipídico en el microambiente tumoral prostático mediante un estímulo *in vitro* con 100 ng/ml de sTWEAK sobre las líneas PC-3 y LNCaP, y la línea celular epitelial prostática sana RWPE-1. También se inhibió en la línea PC-3 el receptor Fn14 utilizando inhibidores de ARN específicos. Además, se utilizaron inhibidores de vías activadas por TWEAK tales como Parthenolide (inhibe la vía canónica del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB)), Amgen16 (que inhibe la vía no canónica del NF-κB), PD184352 (que inhibe la vía de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2)) y MK2206 (inhibidor de la vía de la Proteína Quinasa B (AKT)) para averiguar las vías implicadas en la unión TWEAK/Fn14 en el CaP. Se estudió la expresión de genes involucrados en vías metabólicas lipídicas y glucídicas mediante la técnica *real time-quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR): Los genes estudiados fueron: genes de entrada de glucosa en la célula (*Solute Carrier Family 2 Member 1*

(*SLC2A1*) y *Solute Carrier Family 2 Member 4 (SLC2A4)*), y genes de la fase de preparatoria Hexoquinasa 1 (*HK1*) y la 6-Fosfofructo-1-quinasa (*PFKM*) y la fase de rendimiento de la glucólisis (la Piruvato Quinasa M2 (*PKM2*), la Piruvato Deshidrogenasa Alfa 1 (*PDHA1*) y la Piruvato Deshidrogenasa Lipoamida Quinasa Isoenzima 4 (*PDK4*)). Respecto a la captación y transporte intracelular de lípidos se cuantificaron los siguientes genes: el Cluster de Diferenciación 36 (*CD36*) y el *Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4)*, genes de *de novo* lipogénesis (Acetil-Coa Carboxilasa (*ACACA*), ATP Citrato Liasa (*ACLY*), Ácido Graso Sintasa (*FASN*)), genes implicados en la lipólisis (Carnitina Palmitoiltransferasa 1 Alfa (*CPT1A*) y Triaglicerol Lipasa (*PNPLA2*)) y dos factores de transcripción estrechamente relacionados con el metabolismo lipídico (Proteína de unión al elemento de respuesta al esteroil 1 (*SREBP-1*)) y el Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (*PPARG*). También se evaluó la expresión proteica de algunos de estos genes mediante la técnica del Western Blot. Se estudió además si los cambios en la expresión provocados por el estímulo de sTWEAK, iban asociados a cambios en la captación de lípidos y acumulación de éstos en las células de CaP mediante kits comerciales.

El segundo estudio se centró en evaluar el efecto de la citocina sTWEAK sobre la liberación de VEs en células de CaP. Para ello, estimulamos con 100 ng/ml de sTWEAK las células de las líneas celulares PC-3 y LNCaP. Se aislaron las VEs, y el cargo de exomiRNAs se cuantificó la expresión de estos miRNAs mediante RT-qPCR utilizando paneles de 752 exomiRNAs relacionados con procesos cancerígenos. Los exomiRNAs candidatos regulados por sTWEAK en las diferentes líneas celulares se validaron en biopsias líquidas de semen y de orina posterior al examen rectal de una cohorte de 97 pacientes. Estos pacientes se clasificaron en 2 grupos, según la agresividad del tumor, siguiendo las directrices de la *International Society of Urological Pathology (ISUP)*: Bajo Riesgo (Grupo I y II) y Alto Riesgo (Grupo III, IV y V). Se cuantificó por la técnica del ELISA los niveles de sTWEAK en semen de estos pacientes. Mediante herramientas estadísticas, se evaluó la utilidad de los exomiRNAs como paneles de pronóstico de la agresividad del CaP junto con los niveles en semen de sTWEAK, los niveles séricos del PSA y la testosterona en suero, la edad y el volumen prostático. Finalmente se establecieron posibles dianas específicas de los exomiR-221-3p mediante diferentes algoritmos: y se validaron dichas dianas en la línea celular PC-3.

Resultados

Observamos que niveles reducidos de sTWEAK en suero en pacientes con CaP junto con niveles elevados de PSA, un índice HOMA-IR elevado y niveles disminuidos de HDL, son predictores independientes de CaP.

Por lo que respecta al metabolismo de la glucosa, hemos observado mediante experimentos *in vitro* que un estímulo con sTWEAK sobre las líneas celulares prostáticas PC-3, LNCaP no altera la expresión de genes de transportadores de glucosa (*SLC2A4* y *SLC2A1*), pero provoca una disminución significativa de la expresión de genes relacionados con la fase preparatoria del glucólisis (PFKM y HK1). En la línea celular PC-3 observamos un aumento de la expresión de genes de la fase de pago de la glucólisis (*PKM2* y *PDHA1*) y una disminución significativa de la expresión del inhibidor de PDHA1, la *PKD4*. Estos cambios podrían estar asociados a un aumento del flujo del piruvato hacia la formación de Acetil-CoA en la mitocondria.

Respecto al metabolismo lipídico, la estimulación con sTWEAK en células de la línea celular PC-3, provocó un aumento significativo de la expresión de genes relacionados con la lipogénesis (*ACACA* y *FASN*), lipólisis (*CPT1A* y *PNPLA2*), transporte de lípidos (*CD36* y *FABP4*) y factores de transcripción estrechamente relacionados con el metabolismo lipídico (*SREBP-1* y *PPARG*). Además, este aumento de expresión génica fue acompañado por un incremento de la entrada y acumulación de lípidos en las células. El silenciamiento de Fn14 en la línea celular PC-3 mediante inhibidores de ARN, confirmó que los cambios en el metabolismo lipídico observados por la presencia de sTWEAK eran consecuencia de la unión de sTWEAK a su receptor *bonafide* Fn14, ya que tras la inhibición y posterior estímulo con sTWEAK no se detectaron cambios en la expresión de los genes *ACACA*, *FASN*, *CPT1A*, *PNPLA2*, *FABP4*, *CD36*, *SREBP-1* y *PPARG*, ni tampoco en la expresión proteica de *FASN*, *CPT1A* y *FABP4*.

Los ensayos con inhibidores específicos (PD184352 y MK2206) de vías de señalización de MAPK (ERK1/2) y de la vía de AKT respectivamente, corroboraron que la fosforilación de ERK1/2 y AKT (ser473) están relacionadas con el metabolismo lipídico en la línea celular PC-3, lo que apunta a ambas vías como posibles dianas terapéuticas para CaP. En el caso del uso del Parthenolide y Amgen16 (inhibidores de la vía de NF-κB de la vía canónica y no canónica respectivamente), no se detectaron cambios en la expresión génica de los genes estudiados, corroborando que ambas vías no están involucradas en la regulación metabólica lipídica de TWEAK en el CaP.

Investigamos la expresión relativa de exomiRNAs regulados por TWEAK en semen y en orina después del examen rectal digital de pacientes con CaP estratificados según las directrices del ISUP en Alto Riesgo y Bajo Riesgo. Identificamos en e líneas celulares de CaP (que sTWEAK era capaz de regular 14 exomiRNAs (exomiRNA-125b-1-3p, -193b-3p, -221-3p, -222-3p, -23a-3p, -27a-3p, -29a-3p, -31-5p, -497-5p, -643, -663b, -940, -9-5p y -99a-3p). Estos exomiRNAs fueron validados en biopsias líquidas de 97 pacientes con CaP. De los 14 exomiRNAs, únicamente la expresión de los exomiR-221-3p, -222-3p y -31-5p estaba significativamente elevados en semen de pacientes con CaP de Alto Riesgo al compararlos con los de Bajo Riesgo,

mientras que la expresión de los exomiR-193-3p y -423-5p estaban significativamente disminuida en los pacientes de CaP de Alto Riesgo en muestras de orina después del examen rectal. Después de diversas combinaciones el panel compuesto por la expresión del exomiR-221-3p y -222-3p y los niveles de sTWEAK en semen, fue el seleccionado como el más eficaz a la hora de clasificar correctamente al 87,5% de los pacientes con CaP más agresivos, con un área bajo la curva de 0,857, especificidad del 85,7% y sensibilidad del 76,9%. Además, establecimos que sTWEAK era capaz de modular dos de las dianas establecidas para el exomiRNA-221 mediante el uso de diferentes algoritmos el factor de transcripción 12 (TCF12) y *Nemo-like Kinase* (NLK) en la línea celular PC-3, ambos genes relacionados con la progresión tumoral en el contexto de CaP. En conclusión, nuestros hallazgos ponen de manifiesto que la detección en biopsia líquida de los exomiRNAs regulados por TWEAK, junto con los niveles de sTWEAK en semen, puede mejorar el pronóstico del CaP.

Conclusiones generales:

- Los niveles séricos de sTWEAK están disminuidos en los pacientes con CaP respecto a pacientes control y, además, junto con los niveles elevados de PSA, un índice HOMA-IR elevado y niveles disminuidos de HDL pueden ser usados como predictores independientes de CaP.
- La unión de TWEAK a Fn14 activa las vías de señalización de ERK1/2 y AKT (ser473), potenciando el metabolismo lipídico en células de CaP y regulando la expresión génica y proteica de genes clave de la entrada de lípidos en la mitocondria para su posterior oxidación (*CPT1A*), la movilización celular de lípidos (*FABP4*) y en la lipogénesis *de novo* (*FASN*) entre otros, e induciendo la captación de ácidos grasos y su acumulación.
- La presencia de sTWEAK en el microambiente de CaP induce la secreción de VEs y modifica el cargo de exomiRNAs
- El panel en semen formado por la expresión relativa del exomiR-221-3p y -222-3p, junto con los niveles de sTWEAK, es capaz de clasificar correctamente al 87,5% de los pacientes con CaP según su agresividad.
- sTWEAK regula la expresión de NLK y TCF12, genes diana del exomiR-221-3p, ofreciendo nuevas vías para el tratamiento del CaP.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Anatomía de la próstata
- Figura 2** Representación histopatológica del Gleason Score
- Figura 3** Las características metabólicas dependen del tejido de origen
- Figura 4** Representación gráfica de la primera etapa de la lipogénesis
- Figura 5** Visión general del metabolismo celular en CaP
- Figura 6** Esquema de la estructura y proteólisis de la citocina TWEAK
- Figura 7** a) Representación esquemática del receptor Fn14 humano. b) Corte proteolítico de Fn14
- Figura 8** Vías de señalización activadas tras la unión de TWEAK con Fn14
- Figura 9** Unión de sTWEAK a CD163 y el corte proteolítico de CD163
- Figura 10** Activación diferencial de las vías NF- κ B y MAPK por TWEAK basado en el tipo de unión con su receptor Fn14
- Figura 11** Representación esquemática de la vía de señalización de NF- κ B canónica
- Figura 12** Representación esquemática de la vía de señalización de NF- κ B no canónica
- Figura 13** Representación esquemática de las cascadas MAPK de ERK1/2 y p38
- Figura 14** Representación esquemática de las vesículas extracelulares, incluidos VEs, microvesículas y cuerpos apoptóticos
- Figura 15** Representación esquemática de la biogénesis y secreción de VEs y microvesículas
- Figura 16** Representación gráfica del papel de la inflamación crónica en el desarrollo del tumor por la acción de citocinas y quimiocina, mediante la secreción de VEs.
- Figura 17** Representación del perfil proteico exosomal de diferentes sobrenadantes celulares y biofluidos humanos mediante la identificación de 3 proteínas de superficie visualizados por el método T-distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE)
- Figura 18** Enriquecimiento lipídico de la membrana celular y exosómica de la línea celular epitelial prostática PC-3
- Figura 19** Composición de los VEs y su cargo
- Figura 20** Biogénesis de los miRNAs
- Figura 21** Mecanismos postulados para la entrada de cargo de microRNA en los VEs.
- Figura 22** Interacción miRNA:ARNm. Esquema modelo de la interacción miRNA con su ARNm diana
- Figura 23** Representación de las funciones de los exo-miRNAs en el contexto tumoral
- Figura 24** Figura resumen del rol de TWEAK en el contexto del CaP

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Niveles de PSA considerados normales según la edad en raza caucásica y el rango de niveles de PSA que permite al especialista tomar una decisión y el porcentaje positivo de tumor en biopsia según el mismo rango
Tabla 2	Clasificación TNM del CaP
Tabla 3	Características morfológicas del cáncer según el grupo del grado ISUP, la puntuación Gleason y el patrón de Gleason y su correspondiente equivalencia
Tabla 4	Clasificación d'Amico establecida en 1998 para la predicción de la recurrencia bioquímica después del tratamiento radical
Tabla 5	Descripción de diferentes marcadores predictivos y de diagnóstico postulados para su uso rutinario en el contexto del CaP
Tabla 6	Líneas celulares más usadas en la investigación en CaP
Tabla 7	Modelos in vivo más usados en el contexto del CaP
Tabla 8	Compuestos testados para el tratamiento del CaP, dirigido hacia el metabolismo lipídico
Tabla 9	Ensayos clínicos activos cuya diana terapéutica es el eje TWEAK/Fn14
Tabla 10	Utilidad clínica como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de la patología de TWEAK y sus receptores, Fn14 y CD163
Tabla 11	Características de las distintas VEs
Tabla 12	Descripción de las diferentes técnicas que se usan para el aislamiento de VEs
Tabla 13	Herramientas de predicción de dianas de miRNAs
Tabla 14	Exo-miRNAs relacionados con procesos proliferativos, invasivos y metastásicos en diversos tipos tumorales
Tabla 15	Exo-miRNAs relacionados con la modulación del sistema inmune en diversos tipos tumorales
Tabla 16	Exo-miRNAs relacionados con la quimioresistencia y quimiosensibilidad en diversos tipos tumorales
Tabla 17	Exo-miRNAs con utilidad pronóstica y/o diagnóstica en diferentes tipos tumorales
Tabla 18	Exo-miRNAs relacionados con procesos proliferativos, invasivos y, metastásicos, de modulación del sistema inmune y de respuesta a tratamiento en aislados a partir líneas celulares de CaP o de biofluidos humanos.
Tabla 19	Exo-miRNAs estudiados como posibles biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y resistencia a tratamientos en el contexto del CaP(biofluidos y líneas celulares)
Tabla 20	Diferentes vehículos de entrega de microRNAs para uso terapéutico
Tabla 21	miRNAs terapéuticos en fase clínica en el área del cáncer

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DEL EFECTO CELULAR Y METABÓLICO DEL EJE TWEAK/FN14 EN EL MICROAMBIENTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Antonio Altuna Coy

ABREVIACIONES

ACACA	Acetil-Coa Carboxilasa	ILVs	<i>Vesículas intraluminales</i>
ACLY	ATP citrato liasa	ING5	<i>Inhibidor del factor de crecimiento 5</i>
ADAM10	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>	ISUP	International Society of urological Pathology
ADAR	<i>RNA-specific adenosine deaminase</i>	JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
ADN	ácido desoxiribonucleico	kDa	kilodaltons
ADP	Adenosina difosfato	lncARN	ARN de cadena larga no codificante
AGO	Argonauta	LPS	Lipopolisacárido
AKT	Proteína Quinasa B	MAGL	Monoglicerol lipasa
ALIX	<i>Apoptosis-Linked Gene 2-Interacting Protein X</i>	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
AMACR	alpha-metilacil-CoA racemasa	MAPKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i>
AML	Leucemia mielomonocítica aguda	MAPKKK/MAP3K	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
AMPK	Proteína Quinasa activada por AMP	MCP-1	Proteína quimotáctica de monocitos 1
AOSMC	<i>Human Aortic Smooth Muscle Cells</i>	MCT	Monocarboxylate Transporter
APAF1	Factor activador de peptidasa apoptótica 1	Mef2c	Myocyte Enhancer Factor 2C
ARN	ácido ribonucleico	MHC	Complejos mayores de histocompatibilidad
ARNm	ARN mensajero	miRISC	miRNA-induced silencing complex
ARNpi	ARN asociado a Piwi	miRNAs	<i>microRNAs</i>
ARNr	ARN ribosomal	ml	<i>mililitros</i>
ARNsc	ARN condicional pequeño	MMPs	<i>Metaloproteínas de la Matriz Extracelular</i>
ARNsn	ARN nuclear pequeño	mTORC1	Diana mecanicista del complejo de rapamicina 1
ARNsno	ARN nucleolar pequeño	mTWEAK	<i>TWEAK anclado en membrana plasmática</i>
ARNT	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear</i>	MVBs	<i>Cuerpos multivesiculares</i>
ARNts	ARN pequeño derivado de transferencia	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
ASCT2	<i>Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2</i>	NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
ATP	Adenosin trifosfato	NF-κB	Cadenas ligeras kappa de las células B activadas
BCL2	B-cell lymphoma 2	NIK	Quinasa inductora de NF-κB
C.elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>	nSMase 2	Esfingomielinasa 2
CA-125	Carcinoma antígeno 125	p53	Proteína 53
CADM1	<i>Molécula de adhesión molecular 1</i>	PACT	Protein activator of kinase protein R
CAMs	Moléculas de adhesión molecular	PAP	Fosfatasa Ácida Prostática
CaP	Cáncer de próstata	PCA3	Antígeno cáncer de próstata 3
CCL5	Quimiocina ligando 5	PDCD4	<i>Proteína 4 de muerte celular programada</i>
CD163	Cluster de diferenciación 136	PDK	3-fosfoinositido
CD36	Cluster de diferenciación 36	PDK1	3-fosfoinositido dependiente de la proteína quinasa 1
CD40	Cluster de diferenciación 40	PDK4	Piruvato deshidrogenasa lipoamida quinasa isoenzima 4
CD63	Lysosome Associated Membrane Protein 3	PFK	Fosfofructoquinasa
CD81	Tetraspanina 28	PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
CD82	<i>Tetraspanina 27</i>	PNPLA2	Triaglicerol lipasa
CD9	Tetraspanina 29	PPARγ	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas

Abreviaciones

Estudio del eje TWEAK/Fn14, y de su efecto celular y metabólico, en el microambiente del Cáncer de Próstata

CDH2	N-Cadherina	Pri-miRNA	microRNA primario
CDK6	Proteína quinasa de división celular 6	PSA	<i>Antígeno prostático sérico</i>
CDKN1B	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1B	PSCA	Prostate stem cell <i>antigen</i>
CPT1A	Carnitina palmitoiltransferasa 1 alpha	PSMA	Prostate-specific membrane antigen
CTE	Cadena transportadora de electrones	PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
DGCR8	Gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge	PTX3	Pentraxina 3
DPP8	Dipeptidil peptidasa 8	RFXAP	Proteína reguladora asociada al factor X
E2H2	Enhancer of zeste homolog 2	RIP1	Receptor <i>interacting protein 1</i>
EGF-R	Factor de crecimiento epidérmico	ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial	ROS	Especies reactivas de oxígeno
ERG	<i>ETS-related gene</i>	SCARB2	Receptor scavenger de clase B de tipo 2
ERK1/2	<i>Quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares</i>	sCD163	<i>CD163 soluble</i>
ERα	Receptor de estrógenos alfa	SCF/βTRCP	Skp, Cullin, <i>F-box containing complex Beta-transducin repeat-containing protein</i>
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required <i>for Transport</i>	sFn14	Fn14 soluble
ESR1	Receptor de estrógenos alfa	SIRT1	Sirtuina 1
ETV1	<i>ETS translocation variant 1</i>	SNAP23	Proteína 23 asociada al sinaptosoma
exomiRNA	microRNA exosomal	SNAREs	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive <i>fusion attachment proteins receptors</i>
FABP	Fatty Acid Binding Protein	SOD	Superóxido dismutasa
FADH2	<i>Flavin adenin dinucleótido</i>	SREBP-1	Proteína de unión al elemento de respuesta al colesterol 1
FASN	<i>Ácido Graso Sintasa</i>	STAT3	<i>Transductor de señal</i> y activador de transcripción 3
FBS	Suero Fetal Bovino	STAT5B	<i>Transductor de señales</i> y activador transcripcional 5B
FGF1	Factor de crecimiento de fibroblastos 1	SUFU	Supresor de <i>homólogo</i> fusionado
FGF11	Factor de crecimiento de fibroblastos 11	TAK1	Factor de crecimiento transformable beta
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2	TAM	Macrófagos asociados a tumores
Fn14/TNF		TARBP	<i>Trans-activation response RNA-binding protein</i>
RSF12A/TWEAKR	Fibroblast growth factor-inducible 14	TCA	Ácido tricarbóxico
FNIP2	<i>Folliculin Interacting Protein 2</i>	TCF4	<i>Factor de transcripción 4</i>
FOXO3a	Factor de transcripción en forma de horquilla regulado por hipoxia	TERF1	Factor de unión a repeticiones teloméricas 1
g	gramos	TGF-α	<i>Factor de crecimiento transformante alfa</i>
GPx	Glutatión peroxidasa	TGF-β1	Transforming Growth <i>factor β1</i>
GSH	<i>Glutatión</i>	Th1	T helper 1
GTP	Guanosin trifosfato	TLR8	<i>Toll-like receptor 8</i>
HAEC	Human Aortic Endothelial cells	TMPRSS2	Transmembrane protease <i>serine 2</i>
HBE	Human Bronchial Epithelial	TNF	Tumor Necrosis <i>Factor</i>
HBMGF-5	Factor de crecimiento de fibroblastos 5	TNFα	Tumor Necrosis Factor Alpha
HIF-1α	Factor inducible pro hipoxia 1 alfa		

Abreviaciones

Estudio del eje TWEAK/Fn14, y de su efecto celular y metabólico, en el microambiente del Cáncer de Próstata

HIPK1	<i>Homeodomain-interacting protein kinase 1</i>	TNM	Tumor-Nódulo-Metástasis
HK	Hexoquinasa	TP53INP1	Proteína tumoral proteína p53 inducible nuclear 1
HMVEC-d	<i>Ghuman Dermal Microvascular Endothelial Cells</i>	TRAF	Factor asociado al receptor de TNF
hnRNP A2 B1	<i>Ribonucleoproteína heterogenea nuclear A2B1</i>	TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
HSL	Hormona sensible a lipasas	TSG101	Tumor susceptibility gene 101
HSP	Proteínas de choque térmico	TSGA10	<i>Testis specific 10</i>
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana	TWEAK	Tumor Necrosis <i>Factor-like weak inducer of apoptosis</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>	UTR	Untranslated region
IFNγ	Interferón gamma	Ve-Cad	Cadherina 5
IGF	<i>Factor de crecimiento insulínico</i>	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
IGF1R	Receptor del factor de crecimiento 1	VEs	<i>Vesículas extracelulares</i>
IKKα	Inhibitor of nuclear factor <i>kappa-B kinase subunit alpha</i>	VIM	<i>Vimentina</i>
IKKβ	Inhibitor of nuclear factor <i>kappa-B kinase subunit beta</i>	xg	<i>fuera g</i>
IL-1	<i>Inteleucina 1</i>	XPO5	<i>Exportin 5</i>
IL-1β	Inteleucina 1 beta	ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homebox 1</i>
IL-6	Inteleucina 6	ZFP36L2	<i>Butyrate Response Factor 2 (EGF-Response Factor 2)</i>
IL-8	Inteleucina 8	ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>
IL-17	Interleucina 17		

Introducción

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de próstata (CaP)

1.1 Anatomía de la próstata

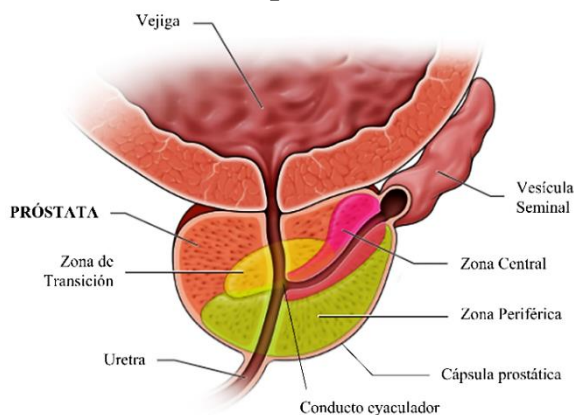


Figura 1 - Anatomía de la próstata. Adaptada de 10.1594/ecr2016/C-0988

Estas secreciones se expulsan hacia la uretra mediante contracciones peristálticas de la pared muscular (1).

La próstata es un pequeño órgano muscular de 4 centímetros de diámetro, formado por un conjunto de 30-50 glándulas túbulo-alveolares organizadas en 3 zonas diferenciadas (Figura 1), que está rodeada por el recto en la parte posterior y la vejiga en la parte superior. Las glándulas túbulo-alveolares sintetizan, entre otros componentes, el líquido prostático, que constituye el 40% del volumen del semen.

1.2. Epidemiología

1.2.1 Incidencia y Factores de riesgo

El CaP es el segundo cáncer más detectado en hombres (14,1% de los cánceres detectados) y la octava causa de muerte por cáncer mundialmente (3,8% de las muertes) (2). Se inicia, normalmente, con un crecimiento anormal de las células de la zona periférica, aunque puede originarse en otras zonas de la próstata (en la zona de transición o en la zona central) (Figura 1). Este crecimiento puede conllevar a la formación del tumor, invadiendo otras zonas de la próstata, la vesícula seminal u producir metástasis en otros órganos (3).

Entre los factores de riesgo asociados con el desarrollo del CaP, descritos en la literatura, encontramos factores genéticos, como mutaciones en los genes *Breast Cancer Type 1 susceptibility protein* (BRCA1) y *Breast Cancer Type 2 susceptibility protein* (BRCA2) (4), y epigenéticos como modificaciones en la metilación del DNA o deacetilaciones en las histonas (4), endocrinos (hormonas, alteraciones del sistema inmune, procesos inflamatorios, infecciones bacterianas), ambientales, derivados del estilo de vida (consumo del alcohol, tabaco, sedentarismo o radiaciones, entre otros factores), la edad, la raza o antecedentes familiares de CaP, entre otros (3).

1.2.2 Diagnóstico del CaP

El CaP muy raramente produce síntomas en su fase inicial (5). Por lo tanto, la detección precoz del tumor es esencial para un mejor pronóstico.

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

1.2.2.1 Antígeno Prostático Sérico (PSA)

En la gran mayoría de los pacientes, la sospecha de CaP se basa en la detección de niveles elevados del antígeno prostático sérico (PSA) en sangre (6). Sintetizado por las células ductales y acinares del epitelio prostático (7,8), el PSA se caracterizó por primera vez en el año 1971 en semen (9), pero no fue hasta 1980 cuando se demostró su presencia en suero y que los niveles séricos en pacientes con CaP o hiperplasia benigna prostática eran superiores a los detectados en pacientes sanos (10,11). Este hecho possibilitó que, en 1986, la *Food and Drug Administration* aprobara la utilización de los niveles de PSA sérico para monitorizar el CaP y en 1994 para su cribaje (12).

Respecto a los niveles séricos de PSA, aunque no existe un valor de referencia, se utilizan niveles superiores a 4 ng/ml para indicar la presencia de tumor (5,13). Ahora bien, hay que tener en cuenta que los niveles de PSA pueden aumentar con la edad, la raza, el ejercicio físico, por afecciones benignas como la prostatitis o la hiperplasia benigna prostática o infecciones del tracto urinario (5,13–15). Además, a partir del PSA derivan otras variables clínicas como la densidad de PSA (es el valor de PSA (en ng/mL) dividido por el volumen prostático (en cc)), velocidad del PSA (describe la velocidad a la que aumenta el PSA durante el tiempo) o la ratio PSA libre/total que han aportado información adicional sobre la evolución de la patología (14). En la Tabla 1 se detallan los niveles de PSA en sangre que se consideran normales según la edad del paciente de raza caucásica, y el rango de niveles de PSA que permiten al especialista tomar una decisión respecto a la sospecha de tumor y el porcentaje de casos positivos de tumor.

Rango de Edad (años)	Niveles basales de PSA considerados normales
40 a 49	0-2,5 ng/ml
50 a 59	0-3,5 ng/ml
60 a 69	0-4,5 ng/ml
Más de 70 años	0-6,5 ng/ml
Rango de referencia niveles de PSA (ng/ml)	Sospecha de tumor
0-2,5 ng/mL	Probabilidad muy baja o inexistente
2,5-4 ng/mL	Probabilidad baja (salvo por factores de riesgo del paciente)
4-10 ng/mL	Sospecha de tener cáncer.
Más de 10 ng/mL	Alta probabilidad
Rango de referencia niveles de PSA (ng/ml)	Porcentaje positivo de tumor en biopsia
0-2 ng/mL	2%-5%
2-4 ng/mL	5%-10%
4-10 ng/mL	25%-40%
Más de 10 ng/mL	50%-65%

Tabla 1 - Niveles de PSA considerados normales según la edad en raza caucásica y el rango de niveles de PSA que permite al especialista tomar una decisión y el porcentaje positivo de tumor en biopsia según el mismo rango.

Así pues, valores elevados de PSA en sangre no es sinónimo de padecer cáncer. Para confirmar la presencia del tumor y caracterizarlo, la realización de pruebas complementarias como resonancias magnéticas, tacto rectal, ecografías o biopsias prostáticas son esenciales para proponer al paciente el mejor abordaje terapéutico (6). A partir del estudio clínico-histológico del

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

tumor, obtendremos la clasificación Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM), el *Gleason Score* de la histología de la biopsia prostática y la clasificación D’Amico que nos informan y permiten clasificar a los pacientes según su posible evolución. Otras clasificaciones de uso son las tablas de Partin (ayudan a predecir si el tumor está confinado en la próstata) o el valor CAPRA (predicen recurrencia bioquímica posterior al tratamiento) (5,16). Además, el uso de diferentes nomogramas predictivos y/o pronósticos también han permitido mejorar la detección del tumor.

1.2.2.2 Clasificación Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM). Estudio de la extensión del CaP

La clasificación TNM es uno de los sistemas de clasificación de tumores más utilizados para conocer la extensión del tumor y su agresividad (17). El *American Joint Committee on Cancer* y el *International Union for Cancer Control* propusieron este sistema como un recurso para que el especialista pueda determinar la etapa tumoral según su extensión, que puede ir más allá de los límites de la próstata (17). En CaP, la clasificación TNM se basa en: **T**, describe el tamaño del tumor primario y su propagación en la próstata; **N**, describe si ha habido o no propagación del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos a la próstata; **M**, describe la presencia de metástasis en otros órganos (17). En la Tabla 2 se describe la clasificación TNM en el contexto del CaP.

Clasificación T		Clasificación N	
Tx	No se puede evaluar el tumor	Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos cercanos a la próstata
T0	No hay evidencia de tumor	N0	No se detecta afectación en los ganglios linfáticos cercanos a la próstata
T1	a Tumor detectado fortuitamente con una extensión ≤ al 5% del tejido	N1	Se detecta metástasis en los ganglios linfáticos cercanos a la próstata
	b Tumor detectado fortuitamente con una extensión ≥ al 5% del tejido	Clasificación M	
	c Tumor identificado mediante biopsia. Extensión ≤ 5% del tejido	Mx	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
T2	a Extensión del tumor ≤ 50% de un lóbulo	M0	No hay metástasis a distancia
	b Extensión del tumor ≥ 50% de un lóbulo	M1	a Metástasis en ganglios linfáticos alejados de la próstata
	c El tumor ha invadido ambos lóbulos		b Metástasis en Hueso
T3	a Extensión extracapsular	c Metástasis en órganos lejanos	
	b Invasión del tumor a la vesícula seminal		
T4	Tumor invade más allá de la vesícula seminal		

Tabla 2 - Clasificación TNM. Fuente: Brierley J.D et al. (17)

1.2.2.3 Gleason Score

La puntuación de Gleason (*Gleason Score*) es el método de diagnóstico histopatológico más utilizado para la determinación de la diferenciación celular en el CaP (18). La clasificación, aprobada por la *International Society of Urological Pathology* (ISUP) (19), se basa en la observación de la diferenciación glandular a partir de la biopsia prostática. Se agrupa en cinco patrones histológicos de crecimiento, asignando una puntuación de 1 a 5 según el grado de diferenciación celular (Figura 2). Las células tumorales similares histopatológicamente a células sanas reciben una puntuación baja. Al contrario, aquellas células histopatológicamente más

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

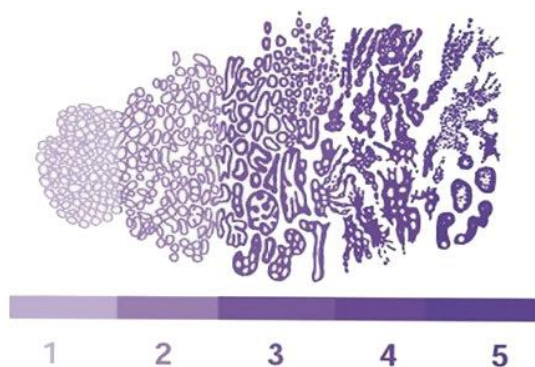


Figura 2 - Representación histopatológica del Gleason Score. Adaptado de Patricia Harnden et al. (18)

diferenciadas, comparativamente de células sanas, se les otorga una puntuación más alta (Figura 2) (19). En la evaluación histopatológica del tumor, se analizan dos biopsias tisulares diferentes. La suma de las puntuaciones de las biopsias proporciona una puntuación que oscila entre el más bajo (1+1) y el más alto (5+5) (19). En la Tabla 3 se muestra el grado de cáncer, según ISUP, con su correspondiente puntuación de Gleason.

su correspondiente puntuación de Gleason.

Grado	Puntuación Gleason	Patrón de Gleason	Características
1	≤ 6		Glándulas individuales y bien diferenciadas
2	7	3+4	Glándulas mayormente formadas, pero se observan algunas glándulas fusionadas o cribiformes
3		4+3	Glándulas mayormente fusionadas o cribiformes, pero se observan algunas glándulas formadas
4	8	4+4	Se observan solamente glándulas fusionadas o cribiformes
		3+5	Glándulas mayormente formadas, pero se observan componentes no glandulares
		5+3	Mayormente no se observan glándulas, pero se observan glándulas formadas
5	9 o 10	4+5/5+4/5+5	Formación de necrosis y no se observan glándulas prostáticas

Tabla 3 - Características morfológicas del CaP según el grupo del grado ISUP, la puntuación y patrón de Gleason y su correspondiente equivalencia. Fuente: Epstein et al (19).

1.2.2.4 Clasificación D'Amico

En el año 1998, D'Amico *et al.* desarrollaron un sistema de estadificación del tumor, ampliamente aceptado y utilizado clínicamente, para optimizar la predicción de la progresión de la enfermedad según si los pacientes tienen un riesgo bajo, intermedio o alto de recurrencia bioquímica después del tratamiento radical (prostatectomía radical, radioterapia, entre otros tratamientos) de tumores clínicamente localizados en la próstata (20).

La clasificación D'Amico se basa en la clasificación T de la clasificación TNM del tumor, en los niveles séricos del PSA anterior al comienzo del tratamiento radical y el *Gleason Score* de la biopsia. En la Tabla 4 se detalla cómo se clasifican los pacientes según el modelo postulado por D'Amico *et al.* en el año 1998.

Clasificación D'Amico	Niveles basales de PSA considerados normales
Riesgo Bajo	T1c o T2a y Gleason < 7 y niveles de PSA en sangre < 10 ng/ml
Riesgo Intermedio	T2b/T2c o Gleason = 7 o niveles de PSA en sangre entre 10 y 20 ng/ml
Riesgo Alto	T3/T4 o Gleason > 7 o niveles de PSA en sangre > 20 ng/ml

Tabla 4 - Clasificación d'Amico establecida en 1998 para la predicción de la recurrencia bioquímica después del tratamiento radical (20)

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

1.2.2.5 Marcadores moleculares del CaP

El CaP raramente es sintomático en su inicio. Anticiparse a la aparición de los síntomas es crucial para un mejor pronóstico. Para ello, se han postulado diferentes biomarcadores predictivos (predicen la evolución de la enfermedad tras un tratamiento concreto), de diagnóstico (identifican si la enfermedad está presente o no) y de pronóstico (proporcionan información sobre la historia natural de la enfermedad, independientemente del tratamiento aplicado). En la Tabla 5 aparecen recogidos algunos biomarcadores postulados según utilidad.

Marcador	Características	Referencias
Antígeno prostático sérico (PSA)	Serina-proteasa de la familia de las calicreínas producida por las células ductales y acinares del epitelio prostático. Procesos patológicos pueden provocar un aumento en la circulación sanguínea. Concentraciones <4 ng/ml en sangre marcan el límite de normalidad fisiológica.	(7,8)
Fosfatasa Ácida Prostática (PAP)	Secretado al lumen glandular, aunque identificado en numerosos órganos. La elevada concentración en sangre se relaciona con padecer CaP metastásico.	(21)
Transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)	Regulador de la transcripción de <i>Erythroblast Transformation Specific translocation variant 1</i> (ETV1) o <i>Erythroblast Transformation Specific-related gene</i> (ERG). La expresión y fusión de TMPRSS2 y ERG puede contribuir al desarrollo de la independencia de andrógenos en el CaP.	(22)
Prostate-specific membrane antigen (PSMA)	Sobreexpresión en células epiteliales prostáticas de pacientes con CaP. Especificidad alta, sensibilidad relativamente baja. Se ha postulado como diana terapéutica	(23)
Prostate stem cell antigen (PSCA)	Glicoproteína de superficie celular correlacionada con la agresividad del CaP	(24)
Enhancer of zeste homolog 2 (E2H2)	Su sobreexpresión se ha vinculado con la progresión del cáncer y mayor riesgo de metástasis.	(25)
Antígeno cáncer próstata 3 (PCA3)	ARN no codificante implicado en la regulación de la vía del receptor de andrógenos sobreexpresado en CaP. Kit ya comercializado en detección en orina	(26,27)

Tabla 5 – Descripción de algunos de los marcadores predictivos y de diagnóstico postulados para su uso rutinario en el contexto del CaP

Aunque el principal objetivo es encontrar marcadores tumorales específicos de CaP, se han realizado diferentes estudios con biomarcadores tumorales que se han descrito en diferentes tumores para determinar su posible aplicación en la detección precoz del CaP, ya sea de forma individual o en combinación con otros marcadores. Entre los marcadores descritos en la literatura cabe destacar interleucina 6 (IL-6) (28), cuyos niveles en suero se encontraron elevados en los pacientes sin respuesta favorable al tratamiento; *transforming growth factor β1* (TGF-β1), cuyos niveles elevados en semen y en suero de pacientes con CaP podría ser utilizado como biomarcador de diagnóstico (29); la E-cadherina, cuya expresión en tejido está disminuida durante procesos invasivos y en metástasis (30) o la expresión elevada del *Zinc finger E-box-binding homeobox 1* (ZEB1) en tumores con un Gleason ≥ 8 (31). La detección de células tumorales circulantes en sangre también ha sido blanco de estudio, pero solo se ha sugerido su uso en pacientes con metástasis (32).

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

De los marcadores mencionados en la Tabla 5, el PSA es el biomarcador universal del CaP, ya que es, hasta el momento, el único marcador específico y sensible de próstata que se conoce (33). Su aplicación en la clínica en la década de los 90 para el diagnóstico, permitió disminuir drásticamente la mortalidad asociada al tumor (6). La falta de especificidad y sensibilidad del PSA respecto al diagnóstico y pronóstico de la agresividad del CaP, como bien se refleja en el porcentaje de positivo según los niveles de PSA en la Tabla 1, ha provocado sobretamientos que ha impactado negativamente la calidad de vida de los pacientes por sus efectos secundarios (disfunción eréctil, incontinencia, toxicidad rectal) e infratamientos de tumores que ponen en riesgo la vida del paciente (34,35).

Por lo tanto, el principal problema en el tratamiento del CaP es la incapacidad de distinguir entre tumores de crecimiento lento y tumores que suponen un riesgo vital para el paciente. Este hecho ha llevado a la comunidad científica a la búsqueda de biomarcadores más robustos o combinarlos con el PSA para mejorar su especificidad, ya que es poco probable que un solo biomarcador nos informe sobre la agresividad (34).

Un estudio publicado en 2014 demostró que la Claudina 3 y la alfa-metisacil-CoA racemasa estaban altamente expresadas en tejido tumoral prostático respecto el tejido prostático no tumoral, mientras que la filamina C y la queratina 5 estaban disminuidas en tejido tumoral (34). A pesar de ello, ningún biomarcador era tan específico como el PSA (34). Además, ningún marcador examinado, ni en combinación, tenía una sensibilidad mayor que el *Gleason Score* por sí solo (34).

Por otro lado, existen diferentes empresas farmacéuticas que ofrecen plataformas de expresión génica para diagnosticar y pronosticar el CaP a partir del uso de tejido biopsiado, es decir, a partir de pruebas invasivas al paciente. Entre ellas destaca Prolaris®. Prolaris® es una prueba que evalúa la expresión de 31 genes relacionados con la progresión tumoral normalizados con la expresión de 15 genes de referencia en biopsia prostática, dando una puntuación que proporciona información sobre si el cáncer puede progresar e invadir otros tejidos o la posibilidad de aparición de tumor, según el momento de obtención de la biopsia (36). Cuanto mayor es la puntuación más riesgo de progresión del cáncer hay (36). En un estudio multivariante con 351 pacientes con CaP observaron que la puntuación Prolaris® se asoció con una mayor probabilidad de letalidad (36). En otro estudio, compuesto por 141 pacientes con CaP tratados con radioterapia, la puntuación de Prolaris se asoció con la recurrencia bioquímica y con la letalidad (37).

Otro panel que destaca es *Oncotype DX® Genomic Prostate Score*. Como en Prolaris®, se basa en la expresión, en tejido biopsiado de próstata, de 12 genes relacionados con la organización celular y estromal, eventos proliferativos y la vía del receptor de andrógeno, normalizados con la expresión de 5 genes de referencia, para evaluar la probabilidad de progresión y metástasis (38).

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

En el estudio de validación del panel, formado por 431 pacientes con CaP estratificados según la agresividad del tumor según el riesgo de padecer recidiva tumoral según la *National Comprehensive Cancer Network*, aseguraron que el panel podía predecir tanto la agresividad del tumor como la recurrencia bioquímica (39).

A pesar de que se han descrito hasta la fecha diversos métodos basados en expresión génica o bien biomarcadores en biofluidos como sangre, orina y semen, queda aún un largo camino de investigación que proporcione marcadores tumorales no invasivos capaces de mejorar al PSA en el diagnóstico y la determinación de la agresividad del CaP.

1.2.3 Tratamiento

Una vez diagnosticado el CaP, existen varias opciones de tratamiento ya sea CaP localizado o metastásico.

La elección del tratamiento para cada paciente depende de diferentes factores, según la finalidad con la que se quiere actuar.

1. La extensión y el grado de agresividad del cáncer (*Gleason Score* de biopsia y Clasificación TNM).
 2. La edad y el estado del paciente (si tiene enfermedades asociadas que pueden agravar el cáncer o pueda afectar el tratamiento).
 3. Efectos secundarios que puede conllevar el tratamiento
- **Vigilancia activa:** La vigilancia activa tiene como objetivo evitar proporcionar al paciente con CaP clínicamente localizado dentro de la próstata y con una esperanza de vida superior a los 10 años, tratamientos agresivos para así poder evitar los efectos secundarios que se derivarían de éstos e intervenir sólo en los casos que el tumor progrese, según criterios estipulados en los protocolos de cada hospital (40). La vigilancia activa implica mediciones de PSA en sangre y biopsias periódicas, entre otras pruebas, que pueden variar según protocolos hospitalarios.
 - **Prostatectomía Radical:** Consiste en la extirpación total del tejido prostático y la resección de ambas vesículas seminales en pacientes con cáncer localizado localmente avanzado (40). A su vez, puede provocar a los pacientes, entre otros efectos, disfunción eréctil y la incontinencia urinaria (41).
 - **Radioterapia:** Consiste en irradiar el tumor mediante fotones que destruyan las células tumorales (ya sea directamente incidiendo en el ADN y/o ARN provocando daños irreversibles o indirectamente mediante la producción de radicales libres), evitando efectos que puedan tener en tejidos aledaños (3).

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- **Supresión de Andrógenos:** El objetivo es reducir los niveles de andrógenos que estimulen la proliferación del CaP en pacientes con tumor diseminado. Puede haber resistencia al tratamiento y, por lo tanto, el tumor progresar sin necesidad del aporte de andrógenos (42).

Por lo tanto, el tratamiento del CaP se puede adaptar a cada paciente, según las características del tumor y el estado de salud del paciente. Así pues, nuevos biomarcadores podrían ayudar al especialista a decidir el tratamiento adecuado que necesita cada paciente.

1.2.4 Modelos in vitro e in vivo para el estudio del CaP

Para el estudio del CaP, las líneas celulares son ampliamente utilizadas. Existen un gran número de líneas celulares que difieren en características claves, como su estadio oncológico o la expresión del receptor de andrógenos, entre otras. En la Tabla 6, se detallan las líneas celulares más utilizadas en la investigación básica del CaP.

Tipo	Modelo Celular	Fuente	Expresión de PSA	Expresión del receptor de andrógenos
Normal	pRNS-1-1	Prostatectomía radical e immortalizadas con el adenovirus 12-SV40	No	Si
	RWPE-1	Células epiteliales aisladas de la zona periferal immortalizadas con el virus del papiloma humano	Si	Si
	BPH 1	Células epiteliales aisladas de un paciente con hiperplasia benigna	No	No
	PNT1A	Células epiteliales prostáticas sanas por transfección con SV40	Si	Si
Dependientes de Andrógenos	RWPE-2	RWPE-1 transformadas mediante el uso del virus del sarcoma murino Kirsten.	Si	Si
	LNCaP	Células epiteliales de CaP aisladas en nódulo linfático	Si	Si
	LAPC-9	Células de CaP metastásico en fémur bajo tratamiento de privación de hormonas	Si	Si
	VCaP	Células de CaP aisladas en metástasis vertebral	Si	Si
	MDA PCa 2a/2b	Células de CaP aisladas en pacientes metástasis ósea	Si	Si
	LuCaP	Células de CaP aisladas de metástasis de nódulo linfático e hígado	Si	Si
Independiente de Andrógenos	ARCaP	Ascitos aspirados de paciente con CaP metastásico óseo	Si	Si
	PC-3	Células epiteliales de CaP aisladas de metástasis ósea	No	No
	DU-145	Células epiteliales de CaP aisladas de metástasis en cerebro	No	No

Tabla 6 - Líneas celulares más usadas en la investigación en CaP. Adaptado de Cunningham et al (43).

De las líneas celulares mostradas en la Tabla 4, se destacan las siguientes por su importancia y su uso en de esta tesis para realizar los estudios *in vitro*:

- **PC-3:** Fue aislada de un paciente de CaP con lesión metastásica vertebral de grado IV (44). Además de no depender de andrógenos para crecer, la línea PC3 tampoco expresa receptores de andrógenos ni PSA (43). Se caracteriza por la elevada expresión del

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

receptor de transferrina, niveles elevados del factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), la expresión aberrante de p53 o la deficiencia en la expresión de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) (43). Estos eventos se han descrito como responsable de la alta velocidad de replicación, calculado en 33 horas el tiempo en el que dobla la población celular (43). La línea celular PC-3 son útiles para investigar cambios bioquímicos en CaP avanzados (metastásicos) y para evaluar la respuesta a tratamientos (43).

- **LNCAp:** Fue desarrollada por el doctor J.S Horoszewicz gracias al aislamiento de células de adenocarcinoma prostático en un nódulo linfático (45). Su estudio está ampliamente establecido gracias a una característica particular, la expresión del receptor de andrógenos. La unión del ligando con el receptor de andrógenos, provoca la activación de cascadas de señalización, conllevando un aumento de la proliferación celular metastásica dependiente de andrógenos. Este hecho conlleva que el tiempo de duplicación sea entre 60 y 72 horas (43). También se caracteriza por la expresión de PSA. Su uso se basa en encontrar cambios moleculares que estén relacionados con el cambio fenotípico más agresivo del cáncer (43).
- **RWPE-1:** Fue inmortalizada con el virus del papiloma humano 18 después de semanas de propagación (46). Comparando con las dos líneas celulares anteriormente mencionadas, la línea celular RWPE-1 es utilizada para contrastar los procesos patológicos del CaP. Entre las características más importantes se encuentra la expresión del receptor de andrógeno y de PSA, (43).

A pesar del amplio uso de diferentes líneas celulares en el contexto del CaP, los modelos *in vivo* ayudan a entender mejor el contexto del CaP

En la Tabla 7, se muestra los modelos *in vivo* más utilizados en la investigación del CaP.

Modelo <i>in vivo</i>	Alteraciones genéticas	Estadio de metástasis
Pten	Ratas knockout del gen PTEN. Su delección se ha demostrado como un proceso temprano en el inicio y progreso del CaP	Nódulos linfáticos y pulmón
TRAMP	Aumento de la expresión de promotores de genes relacionados con la aparición de metástasis	Hueso, nódulos linfáticos, pulmón, glándula adrenal y riñón.
Hi Myc	Inducción de la expresión de c-myc y sensibilización a los andrógenos.	No
Lo Myc	Silenciamiento de c-myc	No
LADY	Deleciones en promotores clave del inicio y progresión tumoral	Nódulos linfáticos, hígado y pulmón.
MPAKT	Desarrollado para estudiar el rol de AKT en la transformación de las células epiteliales prostáticas. Se le realizó una sobreexpresión de AKT, entre otras alteraciones.	No

Tabla 7 – Modelos *in vivo* más usados en el contexto del CaP. Adaptado de Cunningham et al (43). **Abreviaciones:** PTEN, fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; AKT, Proteína Quinasa B

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

1.3 Inflamación y CaP

La inflamación se asocia con el desarrollo y la progresión del cáncer (47). La relación entre la inflamación y el cáncer se remonta a 1863. El médico Rudolf Virchow describió por primera vez la infiltración de leucocitos y su distribución en los tejidos neoplásicos. Propuso que dicha distribución eran “restos tisulares de inflamación crónica” (48). Evidencias científicas mostraron que existe una fuerte asociación entre enfermedades inflamatorias crónicas tales como gastritis, hepatitis o prostatitis y un mayor riesgo de desarrollar carcinomas en el órgano afectado (48).

Las células responsables de la inflamación asociada al cáncer son genéticamente estables y no están sujetas a una rápida aparición de resistencia a los medicamentos, proporcionando así un fondo preferido para el desarrollo de tumores (47). Por lo tanto, representan una buena estrategia tanto para la prevención del cáncer como para la terapia. La inflamación extrínseca del tumor es causada por múltiples factores, que incluyen infecciones bacterianas y virales, enfermedades autoinmunes, obesidad, tabaquismo, consumo excesivo de alcohol (48). Por el contrario, la inflamación intrínseca del cáncer puede desencadenarse por mutaciones que inician y contribuyen a la progresión maligna a través del reclutamiento y activación de células inflamatorias (48).

La inflamación continua genera una cantidad significativamente elevada de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, proliferación descontrolada y activación de oncogenes y/o pérdida de la expresión de genes supresores de tumores. Todo ello, aumenta el riesgo de desarrollar neoplasias, incluido el CaP (47).

En el contexto del CaP, la inflamación prostática está involucrada con la atrofia inflamatoria proliferativa, relacionada con el desarrollo del CaP. Alrededor del 18% de los hombres que padecen prostatitis pueden desarrollar CaP. Además, se ha descrito que pacientes con inflamación crónica tienen el doble de riesgo de desarrollar CaP de alto riesgo (49).

La elevada producción de citocinas inflamatorias, tales como la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6, interleucina 8 (IL-8) o *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α) se han relacionado con el desarrollado del CaP. En el caso de la IL-1, se ha demostrado que una exposición crónica promueve el crecimiento tumoral independiente a la acción de andrógenos (50). Varios estudios demostraron que IL-6 tiene un papel crucial en la proliferación y supervivencia tumoral a través de la vía del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (51,52). Se ha observado que la producción de IL-8 promueve la proliferación celular mediante la inhibición de la apoptosis a través de la vía de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (53) y la metástasis en hueso (54). Por otro lado, TNF α induce la supervivencia tumoral y la migración del CaP mediante STAT3 vía NF- κ B posibilitando la transición epitelial mesenquimal (55).

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

1.4 Reprogramación metabólica en el CaP

Las células obtienen el poder reductor (Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) o flavín adenín dinucleótido (FADH₂ y derivados) entre otros) y la energía necesaria (adenosin trifosfato (ATP), guanosin trifosfato (GTP)) para sintetizar cualquier componente de su estructura mediante los diferentes procesos metabólicos. Al ser de vital importancia para la viabilidad celular, el metabolismo está altamente regulado mediante la actividad de diferentes enzimas, que en el caso de tumores varía según el tipo celular (Figura 3).

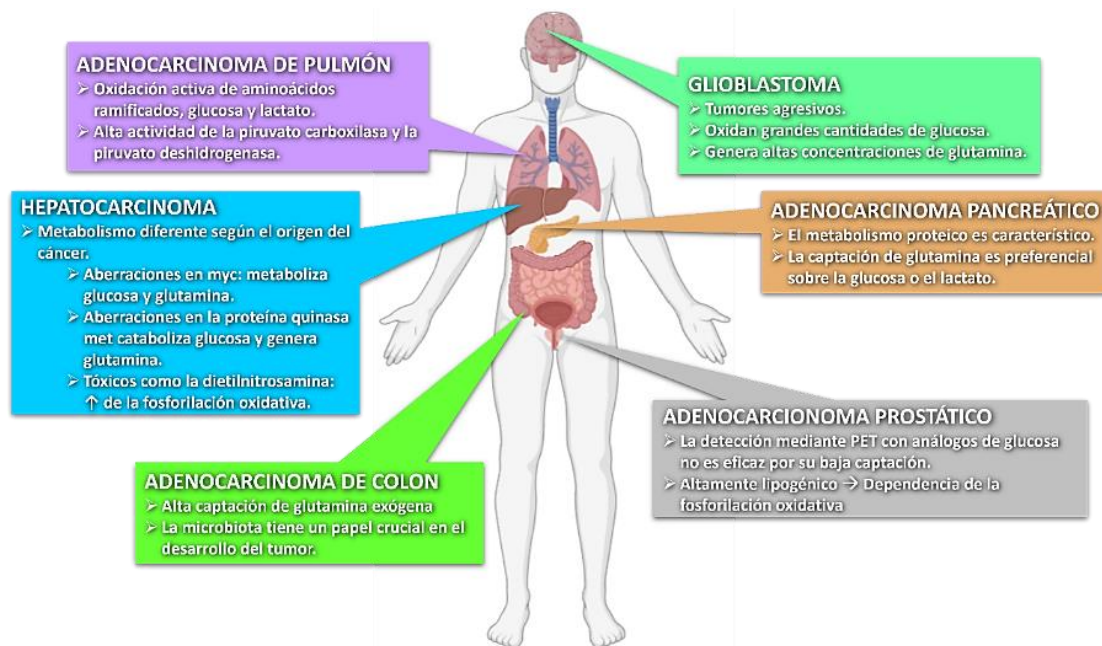


Figura 3 – Las características metabólicas de los tumores dependen del tejido de origen. Los tumores muestran diferencias metabólicas según factores intrínsecos y extrínsecos de la célula. El CaP, a diferencia de otros tumores, no depende de la glucosa (baja captación de análogos de glucosa mediante PET), sino que es altamente lipogénico y dependiente de la fosforilación oxidativa. Adaptado de (56). Creado con BioRender.com

En el contexto del cáncer, la disregulación de la proliferación está acompañada por un mayor requerimiento energético y estructural (57). Este hecho está relacionado con cambios en la regulación y las interacciones de las diferentes vías en el metabolismo celular (glicólisis, lipólisis, lipogénesis entre otras vías) causado por mutaciones genéticas o estímulos externos mediante citoquinas (IL-6, IL-8 o IL-1) o quimiocinas (57,58). En consecuencia, la reprogramación metabólica en el contexto del cáncer produce metabolitos que pueden actuar como oncogenes, alterando el funcionamiento fisiológico. La primera evidencia de la reprogramación metabólica en el contexto del cáncer fue establecida por Otto Warburg. Observó que la proliferación elevada de las células tumorales de ascitis era causada por un aumento del consumo de glucosa, comparando con células sanas. A su vez, observó que secretaba una mayor cantidad de lactato, incluso en condiciones aeróbicas. Este efecto se conoce como “Efecto Warburg” (59).

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

El CaP presenta propiedades metabólicas únicas respecto a otros tumores. Si bien la mayoría de los tumores tienen una elevada tasa de captación y uso de glucosa, el metabolismo del CaP muestra una disminuida tasa de captación y oxidación glucídica. La producción de altas dosis de citrato, niveles elevados de zinc y la captación y uso del piruvato exógeno como fuente para el ciclo de Krebs, y así mantener los niveles elevados de citrato, son hechos remarcables dentro del contexto metabólico de la próstata (56).

Como resultado, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa está alterado, resultando en la disminución de niveles de citrato, respecto a tejido sano, por su oxidación y su uso posterior para la lipogénesis (Figura 4) (60).

1.4.1 Metabolismo lipídico en el CaP.

Las diferentes familias de lípidos son esenciales en la progresión del CaP actuando como componentes de membranas, intermediarios de la transducción de señales, en el tráfico intracelular o en la polarización celular (60).

Un hecho interesante es la observación del papel del tejido adiposo dentro del contexto del CaP. Gazi *et al.* demostraron que los ácidos grasos almacenados en los adipocitos pueden ser captados por las células de CaP y ser usados como fuente energética, evidenciando una vez más el importante papel de los lípidos en el progreso tumoral (61). Posteriormente, se demostró que la supresión de la expresión del transportador Cluster de diferenciación 36 (CD36), responsable de la captación de ácidos grasos externos, disminuía la progresión tumoral en modelos murinos (62). Además, se ha relacionado la sobreexpresión del transportador intracelular lipídico *Fatty Acid Binding Protein* (FABP) con la agresividad del tumor y la prognosis de metástasis (63). La expresión de ambos transportadores está regulada por el receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ), asociado con la etapa tumoral (64).

Los tumores de próstata captan metabolitos exógenos como la glutamina, el lactato acetato o el piruvato mediante los receptores correspondientes (*Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2* (ASCT2) para la glutamina y el *Monocarboxylate Transporter* (MCT) para el lactato, acetato y el piruvato) en vez de glucosa, produciendo intermediarios de vías lipídicas (Figura 4). Este hecho ha permitido el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y seguimiento para la observación del tumor mediante marcaje molecular como el acetato con carbono 11 o el piruvato, lo que denota la importancia de la incorporación de ambos compuestos por parte de la célula, y de la lipogénesis como proceso oncogénico (65,66).

La alteración del metabolismo lipídico en el contexto del CaP se ha relacionado con su patogénesis (67). Por ese motivo, diferentes puntos clave del metabolismo lipídico, se han estudiado como posibles dianas terapéutica (60).

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

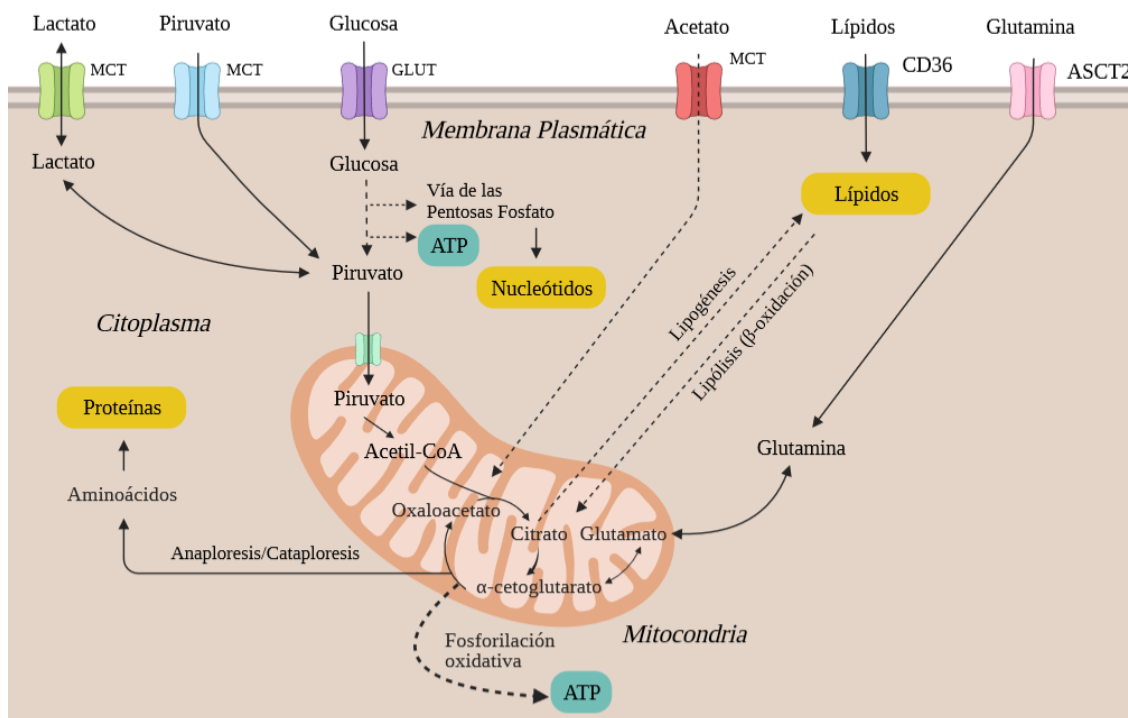


Figura 4 – **Visión general del metabolismo celular en CaP.** La reprogramación metabólica en el CaP impulsa la fosforilación oxidativa y la lipogénesis. Como resultado, el ciclo de Krebs está altamente inducido para proporcionar citrato para la lipogénesis y para la fosforilación oxidativa. Los tumores de próstata asimilan una gran variedad de metabolitos exógenos (piruvato, acetato, lactato, glutamina entre otros), permitiendo el desarrollo de nuevos enfoques para el diagnóstico y control del tumor. Adaptada de Bader et al. (56). Creado con BioRender.com
Abreviaciones: MCT, Monocarboxylate Transporter; GLUT, transportador de glucosa; CD36, Cluster de diferenciación 36; ASCT2, Alanine, Serine, Cysteine Transporter 2; ATP, adenosín trifosfato

1.4.1.1 Lipogénesis

La lipogénesis es el proceso por el cual se generan los diferentes componentes para la formación de la membrana plasmática celular, metabolitos intermedios que pueden formar parte de diferentes vías de señalización intracelulares o cómo sustrato para los requerimientos energéticos mediante la β -oxidación en la mitocondria.

En la gran mayoría de tejidos humanos sanos, la captación de lípidos prima a la síntesis *de novo* de los mismos, incluso siendo inhibida, excepto en el hígado, en el tejido adiposo y en la mama durante la lactancia (68). En los tumores, Medes *et al.* demostraron que hay una elevada síntesis de ácidos grasos y colesterol *de novo*, que era independiente a los niveles lipídicos circulantes en sangre, y que moléculas derivadas del metabolismo glucídico servían de sustrato para la síntesis de ácidos grasos (69).

Por lo tanto, no es extraño que se haya descrito la lipogénesis como un proceso clave del desarrollo de tumores y, enzimas clave de este proceso celular, como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y/o dianas terapéuticas.

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

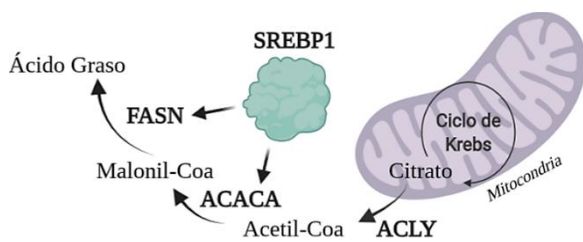


Figura 5 - Representación gráfica de la primera etapa de la lipogénesis. Creado con BioRender.com

La lipogénesis tiene lugar en el citoplasma (Figura 4). Se inicia con la conversión del citrato, que proviene del ciclo de Krebs, a acetil-CoA y oxaloacetato por la enzima ATP citrato liasa (ACLY) (70). Seguidamente, el acetil-CoA es convertido en malonil-CoA

por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACACA) y ácido graso sintasa (FASN) produce ácido palmítico (16:0) (Figura 5) (70). La actividad de las 3 enzimas se ha relacionado con procesos tumorales, entre los que destaca el CaP (70). La sobre expresión de FASN se ha asociado con la agresividad del CaP, con la aparición de metástasis en hueso y con la supervivencia (71–74). La proteína de unión al elemento de respuesta al estero1 (SREBP-1) es el factor de transcripción que regula la expresión de ACLY, ACACA y FASN (Figura 5) (70). Se ha observado que la sobreexpresión de SREBP-1 aumenta la proliferación y la invasión del CaP (75–77).

Además, los ácidos grasos pueden sufrir modificaciones por desaturasas y/o elongasas antes de que sean utilizados. Se ha demostrado que hay sobreexpresión de éstas y se ha descrito que tienen un papel clave en el desarrollo del CaP (78,79).

Al ser la lipogénesis una vía anabólica necesita grandes cantidades de NADH y derivados, y acetil-CoA. El aumento de la lipogénesis en las células tumorales no solo es a causa del aumento de expresión de las enzimas de la vía lipogénica, sino también de cambios metabólicos en otras vías metabólicas acopladas, como el ciclo de Krebs, la vía de la pentosa fosfato, la glucólisis o la vía del fosfoinositol 3-quinasas/Proteína Quinasa B (PI3K/AKT) (57,80,81).

1.4.1.2 Lipólisis

La lipólisis se ha vinculado con la progresión del CaP. La lipólisis se ha descrito como proceso clave para la metástasis y la modulación del proceso de transición epitelial-mesenquimal (82,83). En 2011, se demostró que el monoacilglicerol lipasa (MAGL), junto con la hormona sensible a lipasas (HSL) y el triacilglicerol lipasa (PNPLA2) se encontraban elevadas en células de CaP, dando a entender que existe una continua degradación de las gotas lipídicas para su uso estructural y energético (84). La inhibición de dichas enzimas resulta en una disminución de procesos asociados a la tumorigénesis y progresión del cáncer (84).

La β -oxidación de ácidos grasos, que se produce en la matriz mitocondrial, es la vía principal de descomposición de ácidos grasos y obtención energética de ellos, convirtiendo el ácido graso se convierte en acetil-CoA para generar ATP en el ciclo de Krebs (Figura 5). El aumento de la β -oxidación podría ser crucial para la viabilidad de las células durante el estrés oxidativo a causa de la alta demanda energética durante el transcurso de los procesos tumorales y la producción de NADPH, que elimina especies reactivas de oxígeno para proteger a las células del estrés oxidativo

Introducción – Cáncer de Próstata

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

(60). Hay evidencias del aumento de la actividad de enzimas de la β -oxidación en CaP, como son la carnitina palmitoiltransferasa I α (CPT1A) o la α -metilacil-CoA racemasa (AMACR) (85,86). El uso del etomoxir, inhibidor de CPT1A, sobre líneas celulares de CaP y en modelos animales inhibe la proliferación y el tamaño tumoral (87). Dada la importancia del metabolismo lipídico en el CaP, no es de extrañar que se haya buscado dianas terapéuticas para su tratamiento. En la Tabla 8 se detallan algunos compuestos que se han testado y sus mecanismos de acción.

Componente	Diana	Modelo de estudio	Mecanismo de acción	Referencia
Metformina	AMPK, mTORC1 y el complejo I de CTE	Estudios preclínicos en pacientes	Inhibe proliferación y aumenta la supervivencia	(88)
IPI-9119	FASN	Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sensibles a andrógenos	Inhibe el crecimiento del tumor	(89)
Fatostatina	SREBP	Modelos de ratón con CaP	Inhibición de la lipogénesis, bloqueo de la progresión y de la metástasis	(90)
MT 63-78	AMPK	Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sensibles a andrógenos	Inhibición de la proliferación, supresión de la lipogénesis e inducción de la apoptosis	(91)

Tabla 8 – Compuestos testados para el tratamiento del CaP, dirigido hacia el metabolismo lipídico. **Abreviaciones:** **AMPK**, proteína quinasa activada por AMP; **mTORC1**, diana mecanicista del complejo de rapamicina 1; **CTE**, cadena transportadora de electrones; **FASN**, ácido graso sintasa; **SREBP**, proteína de unión a elementos reguladores de esteroides

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

2. Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) es una citocina multifuncional de la familia de *Tumor Necrosis Factor* (TNF) que controla actividades celulares diversas como la proliferación, migración, diferenciación, apoptosis, angiogénesis o inflamación. (92,93).

El hallazgo de TWEAK en 1997 fue casual. Chicheportiche *et al.* observaron fenómenos apoptóticos en la línea celular humana de adenocarcinoma de colon de grado II HT29 sensible a interferón gamma (IFN γ) (94). Dicho efecto no es exclusivo de TWEAK. Citocinas como *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) y apoproteína-1 también activan la apoptosis mediante su unión a *death receptors*, catalizando la activación de la caspasa-8 que propaga la señal de muerte celular mediante el receptor *interacting protein 1* (RIP1) (95).

2.1 Estructura

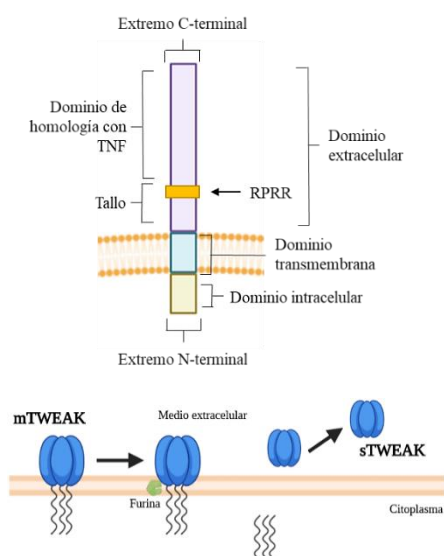


Figura 6 – Esquema de la estructura y proteólisis de la citocina TWEAK. Figura adaptada de Wajant *et al.* (92). Creado con BioRender.com **Abreviaciones:** RPRR: Motivo de unión de la furina; TNF: Factor de necrosis tumoral; mTWEAK: TWEAK anclado en la membrana plasmática; sTWEAK: TWEAK soluble.

TWEAK se ha descrito principalmente en monocitos humanos activados por INF γ (96). TWEAK está anclada como una proteína transmembrana de tipo II (mTWEAK) de 249 aminoácidos (27 kDa). Su estructura está formada por un dominio C-terminal extracelular de 206 aminoácidos, que consta del tallo y un dominio de homología a otras citocinas de la familia de TNF, que contiene el sitio de unión al receptor; un dominio transmembrana de 25 aminoácidos y un dominio N-terminal intracelular de 18 aminoácidos (Figura 6) (94). Como en la mayoría de las citocinas de la superfamilia de los TNF, TWEAK puede sufrir un procesamiento proteolítico en la región C-terminal, concretamente en la secuencia RPRR (Figura 6) por parte de una furina, dando lugar a la forma soluble de 156 aminoácidos (18 kDa), y biológicamente activa (sTWEAK) (92).

2.2 Expresión

Con respecto a los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm), TWEAK se ha detectado en la gran mayoría de los órganos humanos como corazón, páncreas, colon, intestino delgado, pulmón, ovario, próstata, linfocitos de los ganglios linfáticos, el apéndice y la sangre periférica. En menor medida, también se ha observado expresión en riñón, testículo, hígado, timo, médula ósea o en tejido adiposo (94,97).

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Las células *Natural Killer* estimuladas con IFN- γ , monocitos y varias líneas de adenocarcinoma de colon, de hígado y mama expresan TWEAK en su membrana celular (92). La expresión de mTWEAK está regulada en procesos tales como daño celular o hipoxia. En este sentido, el factor de transcripción en forma de horquilla regulado por hipoxia (FOXO3a) y el IFN- γ se han descrito implicados en la regulación de la expresión de TWEAK en ratones deficientes en *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit Beta* (IKK β). (98).

2.3 Receptores de TWEAK

Hasta la fecha se han descrito 2 receptores para TWEAK: Fn14 y CD163.

2.3.1 Fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14)

Fn14 se identificó en el año 2001 en bibliotecas de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), al que llamaron receptor de TWEAK (TWEAKR) (99). La secuencia de aminoácidos mostrada por Wiley *et al.* era idéntica a la descrita por Winkles *et al.* a finales de los 90. Observaron que su expresión se incrementaba cuando las células quiescentes eran expuestas al factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2 (FGF1 y FGF2) y un peso de aproximadamente 14

kDa (12). A parte, Fn14 también recibe otros nombres como TNFRSF12A, según el comité de nomenclatura Gene HUGO (101).

En la Figura 7 podemos observar la estructura proteica de Fn14. Su tamaño es de 102 aminoácidos, siendo el receptor más pequeño de la superfamilia del TNF (102). La región extracelular está compuesta por 53 aminoácidos, que contiene el sitio de unión de TWEAK, rico en cisteínas con la que forma 3 puentes disulfuro (101). La región citoplasmática, de 28 aminoácidos, contiene la región del factor asociado al receptor de TNF (TRAF), capaz de reclutar TRAF1, TRAF2, TRAF3 y TRAF5 y unirlos mediante dos residuos de treonina fosforilados (101). Las proteínas TRAF son una familia de proteínas adaptadoras que se asocian a los receptores de la familia de TNF activando vías de señalización implicadas en proliferación y supervivencia (27).

Muchos receptores de la superfamilia de TNF experimentan escisiones proteolíticas para generar

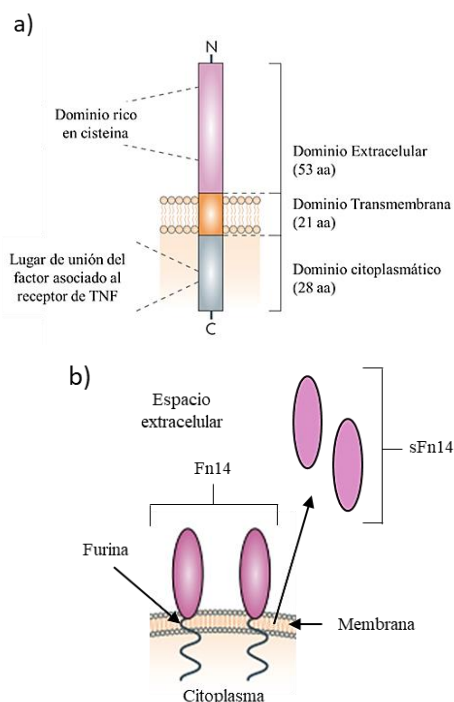


Figura 7 – a) Representación esquemática del receptor Fn14 humano. b) Corte proteolítico de Fn14. Fn14 puede sufrir un corte proteolítico mediante una furina, produciendo la forma soluble de Fn14 (sFn14). Adaptado de Winkles (101). **Abreviaciones:** aa: Aminoácidos; TNF: Tumor Necrosis Factor; Fn14: Fibroblast growth factor-inducible 14; sFn14: Fn14 soluble.

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

formas solubles. Fn14 puede ser liberada al medio extracelular mediante una furina, dando lugar a la forma soluble de Fn14 (sFn14) (101). Hasta la fecha, niveles elevados de sFn14 se han detectado sólo en orina de pacientes con diversas patologías renales (105).

La gran mayoría de los receptores de la superfamilia de TNF son internalizados una vez unidos a su ligando (93,96). Una vez que TWEAK se une a Fn14, el eje formado es internalizado y degradado (101), induce diversas vías de señalización tales como la vía de señalización NF-κB, activando diferentes procesos celulares (106) (Figura 8). La internalización ligando-receptor también podría ocurrir constitutiva e independientemente a la unión a TWEAK (107).

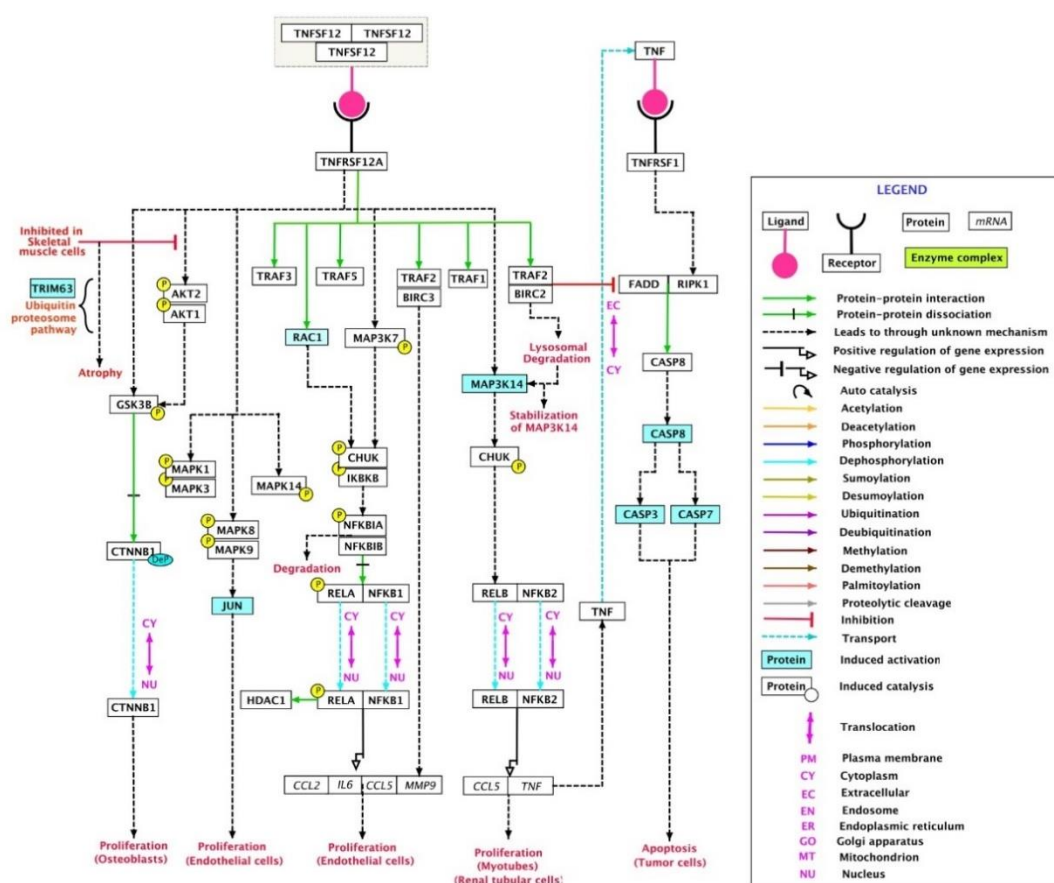


Figura 8 - Vías de señalización activadas tras la unión de TWEAK con Fn14. Fuente: Fuente: <http://www.netpath.org/netslim/>

Fn14 es un receptor altamente inducible por factores de crecimiento o citocinas (101). Los niveles de expresión de Fn14 son prácticamente indetectables en la mayoría de tejidos sanos, y aumenta en situaciones de daño tisular agudo, en contextos inflamatorios como artritis reumatoide, enfermedades hepáticas inflamatorias o intestinales (92).

También se ha observado altamente expresado en tumores sólidos como cáncer de cerebro, mama, cervical, esófago, hígado, testicular o próstata, entre otros (101,108). El aumento de la expresión de Fn14 se ha utilizado como biomarcador en adenocarcinoma de esófago (109), en cáncer gástrico (110), en cáncer de pulmón de células no pequeñas (111) o en carcinoma hepatocelular

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

(112) entre otros. Se ha comprobado sobre células tumorales primarias que el eje TWEAK-Fn14 puede actuar como un potente regulador del crecimiento del tamaño del tumor y su agresividad mediante el control de procesos invasivos, supervivencia celular y angiogénesis (106,113). Este hecho lo convierte en una posible diana terapéutica en el contexto del cáncer.

2.3.2 Cluster de Diferenciación 163 (CD163)

sTWEAK también puede unirse a CD163 (114). Un estudio realizado por Moreno *et al.* en la línea de monocitos humanos THP-1, demostraron que la interacción TWEAK-CD163 interfiere en la unión de TWEAK a Fn14, provocando su internalización y retirando de la circulación a sTWEAK, sin generar respuesta biológica alguna (115). Por lo tanto, todo parece indicar que la unión de sTWEAK a CD163 es un proceso de *scavenger*.

CD163 es una proteína transmembrana de tipo I de la familia de receptores scavenger con 9 dominios ricos en cisteínas (116). Dichos dominios están unidos a un segmento transmembrana y una cola citoplasmática que puede sufrir *splicing* y dar, como resultado, la forma soluble de CD163 (sCD163) (116) (Figura 9).

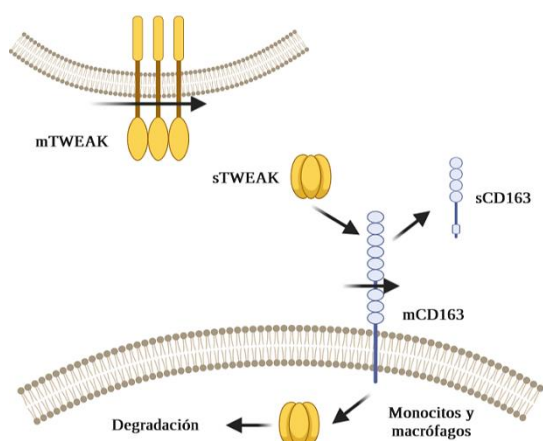


Figura 9 - Unión de sTWEAK a CD163 y el corte proteolítico de CD163. CD163 puede ser liberado a la circulación sanguínea. Creado con BioRender.com

sCD163 se encuentra de forma constitutiva en el plasma sanguíneo humano. En enfermedades inflamatorias donde la actividad de los macrófagos es elevada, la concentración plasmática de sCD163 está aumentada, como en el caso de la diabetes tipo I, la artritis reumatoide, la obesidad o la diabetes gestacional, entre otras (117–120).

La expresión de diferentes proteínas de superficie de macrófagos asociados a tumores (TAM) se ha utilizado como posibles marcadores para su clasificación, entre los que figura CD163. Se ha observado que macrófagos del tipo M2 expresan niveles elevados de CD163 (118), pero se han realizado pocos estudios con respecto a la evaluación de sCD163 como marcador tumoral. Entre los estudios realizados destaca la posible utilidad de sCD163 como marcador de supervivencia en melanoma maligno (121).

Además, se han observado niveles elevados de sCD163 en pacientes con leucemia mielomonocítica aguda (AML) de tipo M4 y M5 (122). A pesar de ello, otro estudio realizado en pacientes con AML no reveló ninguna correlación entre los niveles de sCD163 y los tipos de AML mencionados anteriormente (123). Por el contrario, se han observado niveles bajos de

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

sCD163 en pacientes con leucemia mieloide aguda con quimioterapia dirigida a el cluster de diferenciación 33 (124).

2.4 Señalización de TWEAK y su relación con el cáncer

La unión, tanto de sTWEAK como mTWEAK, a Fn14 provoca la formación de trímeros de Fn14 que, mediante la unión a TRAF en el dominio intracelular, da lugar a la activación de las vías de señalización correspondientes, tales como las vías canónica y no canónica de NF- κ B, la vía de las *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) entre otras (Figura 10) (101).

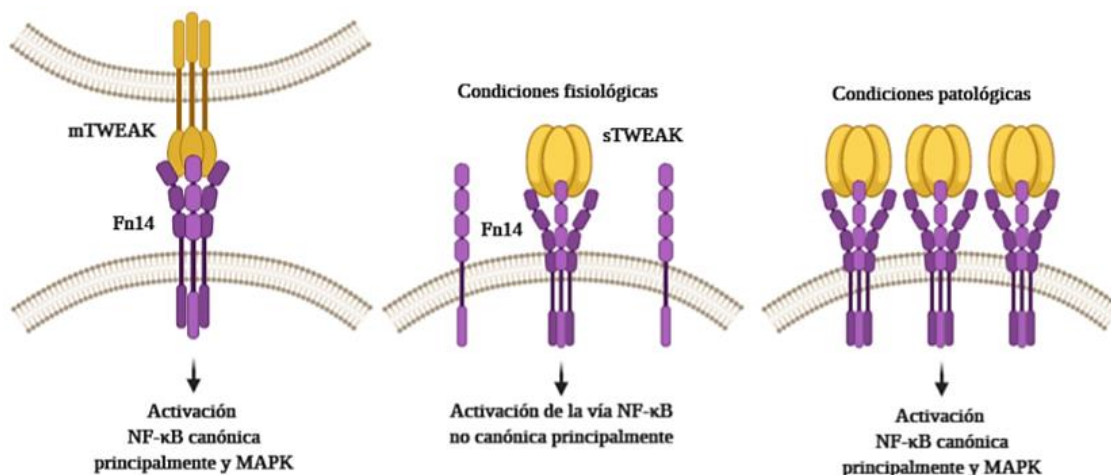


Figura 10 - Activación diferencial de las vías NF- κ B y MAPK por TWEAK basado en el tipo de unión con su receptor Fn14. Adaptado de Enwere et al. (125). Creado con BioRender.com Abreviaciones: sTWEAK, TWEAK soluble; mTWEAK: TWEAK anclado en membrana, Fn14: Fibroblast growth factor-inducible 14; NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; MAPK: Mitogen-activated protein kinase

TWEAK puede señalizar yuxtacrinamente o paracrinamente, como mTWEAK o sTWEAK respectivamente, mediante su receptor *bonafide* Fn14 (101,126), como se puede observar en la Figura 10. En la señalización yuxtacrina, mTWEAK favorece la trimerización de Fn14 en la célula opuesta, lo que conduce a un aumento de la señalización canónica NF- κ B y la activación de MAPK (125). Por otro lado, en condiciones fisiológicas, paracrinamente, los niveles de sTWEAK inducen la activación no canónica de NF- κ B. Sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas, sTWEAK también puede conducir a una señalización hiperactiva que conduce a la señalización canónica de NF- κ B y MAPK (125).

No se conocen los mecanismos por los que se activa patológicamente el eje TWEAK/Fn14, pero se cree que surge de la intercomunicación de las distintas vías, como la vía de activación de la quinasa inductora de NF- κ B, o a través del complejo formado por la ubiquitina ligasa E3-TRAF6 (125,127).

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

2.4.1 NF-κB canónica

La activación de la vía clásica o canónica de NF-κB se produce por señales proinflamatorias tales como las mediadas por citoquinas como TNFα o TWEAK, factores de crecimiento, estímulos inmunológicos, estrés fisicoquímico, moleculares asociados a patógenos, entre otros factores (128).

La unión de TWEAK a su receptor Fn14 activa las proteínas TRAF, que a su vez activa el factor de crecimiento transformable beta (TAK1). Posteriormente, el complejo de quinasas IKK se activa mediante fosforilación por TAK1. El complejo IKK está formado por la proteína adaptadora *NF-kappa-B essential modulator* (NEMO) y 2 quinasas IκB (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit Alpha* (IKKα) y IKKβ) que se encuentra inactivo en el citoplasma (128,129) (Figura 11). Una vez activada, el complejo de quinasas IKK se fosforilan en dos residuos de serinas N-terminales para ser posteriormente ubiquitinadas por la ubiquitina-ligasa

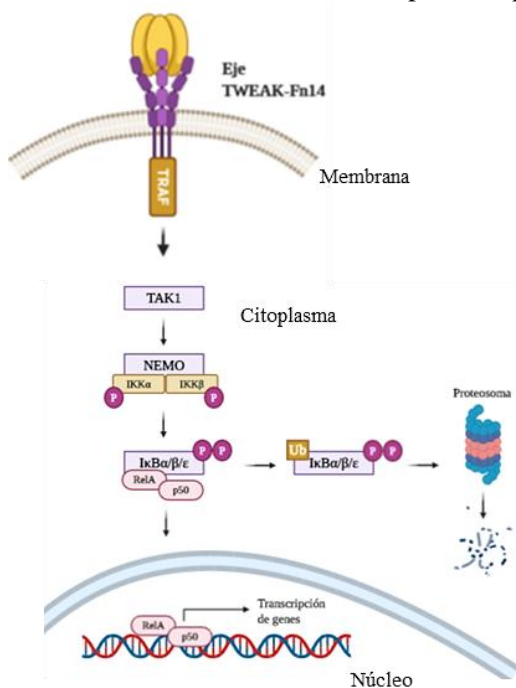


Figura 11 - Representación esquemática de la vía de señalización de NF-κB canónica. Creado con BioRender.com

Skp, Cullin, F-box containing complex Beta-transducin repeat-containing protein (SCF/βTRCP) y degradado el complejo vía el proteosoma 26S (130).

Dicha ubiquitinación y degradación libera p50/RelA (también llamada p50/p65) hacia el núcleo y permite la activación transcripcional de diferentes genes como TNFα, proteína quimotáctica de monocitos 1 (MCP-1), quimiocina ligando 5 (CCL5), *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), la interleucina 1 beta (IL-1β) o la IL-6, entre otros (131) (Figura 11).

En el contexto del CaP, varios estudios han demostrado que NF-κB promueve la supervivencia, proliferación e invasión celular, puesto que interactúa con factores de transcripción implicados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis (132). También favorece el proceso de transición epitelial-mesenquimal y procesos metastásicos ya que induce la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) como MMP-9 y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (133). En relación con la metastasis ósea de CaP, Jin *et al.* determinaron que la vía canónica de NF-κB aumenta la expresión de genes que incrementa la osteoclastogénesis (134).

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

2.4.2 NF- κ B no canónica

A diferencia de la vía canónica, en ausencia de estímulo, la vía NF- κ B no canónica se mantiene inactiva por la ubiquitinación continua y la degradación proteasomal de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) por la activación de TRAF3 (135) (Figura 12). El eje TWEAK/Fn14 activa preferencialmente la vía no canónica (106).

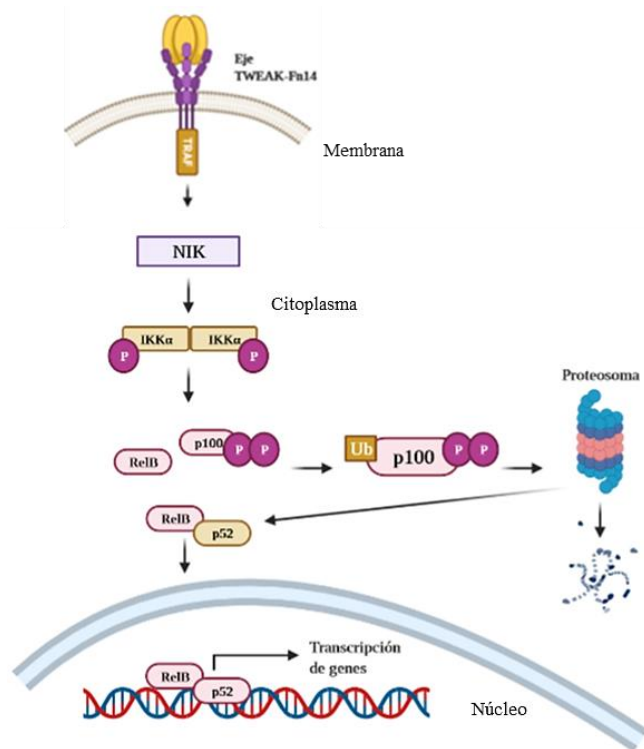


Figura 12 - Representación esquemática de la vía de señalización de NF- κ B no canónica. Creado con BioRender.com

La activación de NIK, mediante receptores de la superfamilia de TNF, es la responsable de la inducción de la vía. NIK fosforila los homodímeros de IKK α . Dicha fosforilación permite la fosforilación de p100 que, además de la ubiquitinación de éste por la ubiquitin-ligasa E2 SCF/ β TrCP, degrada parcialmente por el proteosoma 26S y se transforma en su forma madura p52, que formará heterodímero con RelB y translocará al núcleo para activar la regulación transcripcional de genes (135) (Figura 12).

En CaP, la actividad del receptor de andrógenos está relacionada con la señalización NF- κ B no canónica. Nadiminty *et al.* demostraron que la expresión de p52 estimula el crecimiento tumoral en la línea celular LNCaP y podría ser responsable de la aparición de la resistencia al tratamiento al unirse a los sitios de unión en el ADN del receptor de andrógenos (136).

2.4.3 Vía de señalización de las MAPKs

Las cascadas MAPKs también pueden ser activadas por TWEAK. Estas vías de señalización intracelulares están conservadas evolutivamente y responden a diversos estímulos extracelulares, controlando procesos celulares fundamentales que incluyen crecimiento, proliferación, diferenciación, motilidad, respuesta al estrés, supervivencia y apoptosis (137). Cada cascada consta de tres quinasas centrales (*Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase* (MAPKKK o MAP3K), *Mitogen Activated Protein kinase kinase* (MAPKK) y *Mitogen Activated Protein kinase* (MAPK), propagando la señal por fosforilación secuencial y modulando la actividad de

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

cientos de sustratos (137). En la actualidad, se han identificado cuatro cascadas de MAPK en mamíferos diferentes, entre las que destacan las quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), y p38 (138).

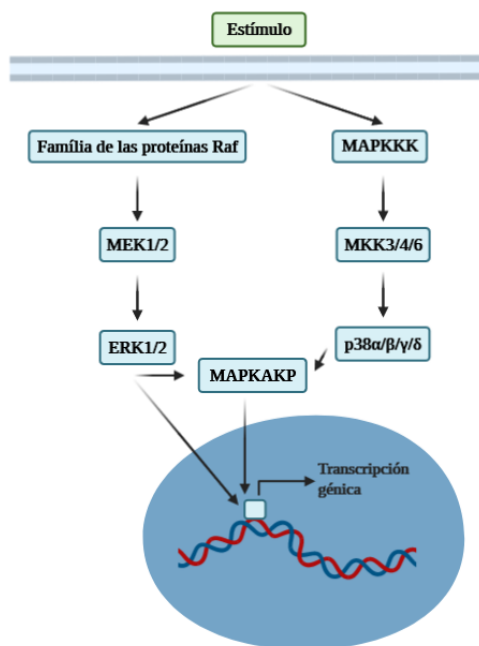


Figura 13 - Representación esquemática de las cascadas MAPK de ERK1/2 y p38

La cascada ERK1/2 es activada por una amplia variedad de estímulos extracelulares que se unen a receptores acoplados a proteínas Ras. Posteriormente, recluta el nivel MAP3K de la cascada (principalmente proteínas Rafs) para para transmitir la señal a niveles inferiores hasta fosforilar ERK1/2 (137,139). ERK1/2 fosforilan diferentes sustratos celulares (137,140) o translocar al núcleo y unirse al genoma actuando como factor transcripcional de varios genes inducidos por citocinas (141) (Figura 13).

Los procesos celulares inducidos por ERK1/2 incluyen la proliferación y diferenciación celular, determinación de la morfología, plasticidad neuronal, supervivencia y respuesta al estrés y apoptosis (140).

La desregulación de la cascada a causa de mutaciones en la expresión proteica de diferentes quinasas juega un papel fundamental en la aparición de lesiones cancerígenas, como en el caso del cáncer de páncreas, melanoma o el carcinoma papilar de tiroides (142).

En el contexto del CaP, la inducción de componentes de la vía de señalización Raf-MEK-ERK se han asociado con un peor pronóstico y la aparición de metástasis (143). En estudios con ratones transgénicos con adenocarcinoma prostático, se ha observado que ERK se correlaciona con la aparición de un fenotipo cancerígeno pobremente diferenciado, metastásico e independiente de andrógenos (144).

La cascada de p38 se activa, principalmente por, estímulos relacionados con el estrés (145). Tras su activación, las señales inducen la fosforilación y activación de las quinasas MKK3, MKK6 y/o MKK4 (137). En esta etapa, las señales se transmiten a las cuatro isoformas de p38 (p38α/β/γ/δ) que se activan debido a su respectiva fosforilación (137) (Figura 13). La cascada p38 puede fosforilar cientos de moléculas, algunas de ellas con ERK1/2 (146). Además de su papel en la respuesta al estrés, p38 juega un papel central en la regulación de los efectos inmunológicos, apoptóticos, senescencia y control del ciclo celular (147), dando lugar a pensar que la desregulación de la cascada puede tener relación con manifestaciones patológicas inmunológicas, autoinmunes, cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes o en cáncer (137,148,149).

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

En el contexto del CaP, diferentes estudios demostraron dualidad en la expresión de p38 según la agresividad del tumor. La expresión proteica de p38 y de su forma fosforilada, se han encontrado aumentada en CaP localizados, mientras que se encontraron los niveles de expresión reducidos en estadios avanzados y metastásicos (150).

2.4.4 Activación de AKT en cáncer

Proteína Quinasa B (AKT) es una serina/treonina quinasa de 57 kDa, crucial en la vía de señalización del PI3K, que modula la función de proteínas implicadas en la inducción de la supervivencia celular, proliferación, migración, metabolismo y angiogénesis (151).

La actividad quinasa de AKT, mediada por su fosforilación por quinasas dependientes de 3-fosfoinositidos (PDK) (151), puede ser inducida por diferentes factores de crecimiento como el FGF, VEGF, el factor de crecimiento epidérmico o el factor de crecimiento insulínico (IGF) entre otros (152). La activación aberrante de AKT se ha observado en varios cánceres humanos, como cáncer gástrico, mama, colón u ovario entre otros. Este hecho se ha descrito necesario en la génesis del cáncer (151).

En el contexto del CaP, se ha observado un alto porcentaje de mutaciones en el gen que codifica PTEN, enzima clave en la vía, provocando que AKT se active constitutivamente (153). La señalización AKT puede inhibir la señalización del receptor de andrógenos al reducir la expresión de la fosfatasa *PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 1* de AKT (154). Además, las vías de señalización de AKT y MAPK activadas con frecuencia en los cáncer independientes de los andrógenos (151). Así pues, debido al crucial papel de AKT en la progresión del CaP y la supervivencia celular, puede representar una prometedora estrategia para el tratamiento del CaP.

2.5 Actividades biológicas de la unión de TWEAK a Fn14

La unión del eje TWEAK-Fn14 desencadena toda una serie de procesos biológicos implicados en muerte celular por apoptosis, proliferación, migración, diferenciación celular, la inflamación, la regeneración de tejidos y la neoangiogénesis (101).

2.5.1 Apoptosis

La unión de TWEAK a Fn14 puede desencadenar apoptosis o bien inhibirla dependiendo del contexto celular en el que se encuentre. TWEAK es capaz de inducir apoptosis a través de un complejo de señalización de muerte que comprende RIP1, el dominio de muerte asociado a Fas y la caspasa-8 (155).

En riñón, la combinación de citocinas, como el TNF α y el IFN- γ , junto con TWEAK conduce a la apoptosis de las células tubulares mediada por caspasas (156).

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

En células de rhabdomyosarcoma Kym1, la actividad citotóxica de TWEAK se ejerce indirectamente a través de la inducción de TNF α (157). También observaron que el eje TWEAK-Fn14 induce la degradación lisosomal del complejo *Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1-TRAF2* en las líneas celulares ováricas SKOV3 y OVCAR4 a TNF α y así activar la muerte celular (158).

En cáncer de endometrio, se ha observado que TWEAK puede promover la apoptosis de las líneas celulares HEC-1A y Ishikawa (159).

En el contexto del CaP, en la línea celular PC-3, Sanz *et al.* demostraron que la activación del eje TWEAK/Fn14 puede promover la apoptosis en PC-3 en presencia de citocinas inflamatorias tales como TNF α o IFN γ y/o sin suero fetal bovino (FBS). No observaron lo mismo en la línea celular LNCaP. A su vez, asociaron dicho proceso con la activación de caspasa-3, la liberación de citocromo C mitocondrial y un aumento de la relación Bax/Bclx (160).

2.5.2 Inflamación

La unión del eje TWEAK-Fn14 es capaz de inducir actividad inflamatoria sobre diversos tipos celulares tales como sinoviocitos, células mesangiales glomerulares, células endoteliales, astrocitos y otras células gliales o en macrófagos (161–163). En dicha actividad, el factor de transcripción NF- κ B juega un papel clave (164).

La translocación nuclear de RelA/p50 de la vía no canónica de NF- κ B, se ha observado que induce la activación moléculas inflamatorias como MCP-1, IL-6 y CCL5 en células estrelladas hepáticas y células tubulares renales murinas (165,166).

En el contexto del CaP, se ha observado que la estimulación con sTWEAK a las líneas celulares prostáticas cancerosas PC-3 y LNCaP aumenta la expresión de la citocina pro-inflamatoria MCP-1 (160).

2.5.3 Diferenciación y adhesión

TWEAK-Fn14 puede inhibir la diferenciación celular. En estudios realizados en preadipocitos primarios humanos *in vitro*, se ha demostrado que TWEAK puede inhibir la diferenciación a adipocitos maduros, reduciéndose la acumulación de lípidos según la dosis administrada (167).

En el contexto del CaP, se ha demostrado que la sobreexpresión de Fn14 modula la expresión la molécula de adhesión de MMP-9 en la línea celular PC-3 aumentando su potencial invasivo (108).

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

2.5.4 Proliferación y Migración

La migración y la proliferación son procesos característicos de los tumores malignos y están estrechamente relacionados con el pronóstico de los tumores.

El rol del eje TWEAK/Fn14 sobre los procesos proliferativos se ha observado en diferentes tipos celulares, como en células del músculo liso pulmonares y células progenitoras neuronales humanas mediante la activación de la vía NF- κ B (168,169) o en queratinocitos inmortalizados por el virus del papiloma humano HPV16 (170). También se ha observado que, en carcinoma hepatocelular, el eje TWEAK/Fn14 podría estar involucrado en procesos proliferativos mediante la inducción y secreción de IL-8 y MCP-1 (171).

La interacción de TWEAK con Fn14 también puede promover la migración celular. Este fenómeno se ha observado en células estrelladas hepáticas mediante la activación de la vía PI3K/AKT (172). También se ha involucrado en procesos migratorios en fibroblastos embrionarios de ratón a través de la activación de la vía de ERK y la inhibición de Fibulina 3 (173). En las líneas celulares de glioma ovario y escamosas, el eje TWEAK/Fn14 induce la migración celular a través de la activación NF- κ B (174–176).

En el contexto del CaP se ha observado que la estimulación con TWEAK de las líneas celulares DU-145 y PC-3 provocaba migración celular mediante la activación de la vía NF- κ B no canónica (177).

2.5.5 Angiogénesis

TWEAK tiene un papel importante en la neovascularización. La implicación del eje TWEAK/Fn14 estaría indirectamente asociada a la aparición de manifestaciones patológicas en el contexto del cáncer, artritis reumatoide, accidente cerebrovascular y degeneración macular relacionada con la edad (101). Jakubowski *et al.* plantearon que TWEAK podría inducir e inhibir según el contexto y el tipo celular en el contexto de la neovascularización (178).

Se ha observado que induce procesos de neovascularización en líneas celulares endoteliales humanas tales como HUVEC, *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells* (HMVEC-d), *Human Aortic Endothelial Cells* (HAEC), *Human Bronchial Epithelial* (HBE) y *Human Aortic Smooth Muscle Cells* (AOSMC) (179).

Las rutas de señalización de TWEAK/Fn14 están también activadas en patologías relacionadas con la neovascularización de la retina en situaciones de isquemia inducida en ratones (180).

En el contexto del cáncer de ovario, se ha observado que la interacción del eje induce la expresión de VEGF mediante la activación de la vía NF- κ B (175). Además, la inhibición de la expresión de TWEAK y/o Fn14 inhibe la expresión de VEGF en células de carcinoma urotelial humano (181).

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

2.6 El eje TWEAK-Fn14 como posible diana terapéutica

Debido a la implicación en diversas patologías, el eje TWEAK-Fn14 ha sido considerado como posible diana farmacológica. El diseño se ha basado en variantes solubles recombinantes de ambas moléculas o bien mediante el uso de anticuerpos específicos. Los efectos terapéuticos se han demostrado *in vivo* en diferentes patologías mediante mecanismos que van más allá del simple bloqueo o activación del eje. En la Tabla 9 se resumen estudios enfocados en tratamientos de otras patologías basados en el eje TWEAK/Fn14 y además están registrados en *crinicalTrials.gov*.

Nombre de la compañía	Agente terapéutico	Enfermedad	Estatus del Estudio	Hipótesis	Identificador/Referencia
<i>Assistance Publique Hopitaux De Marseille</i>	Etanercept	Artritis psoriásica reumatoide	Fase 3	Etanercept puede imposibilitar la unión entre TWEAK y Fn14	NCT02164214
<i>Gulhane School of Medicine</i>	Amlodipina (10 mg) y Valsartan (160 mg)	Diabetes proetinúrica con hipertensión	Fase 4	Amlodipina y Valsartan bloquea PTX3 podría aumentar los niveles de sTWEAK en suero.	NCT00921570
<i>Biogen</i>	BIIB023 (Anti-TWEAK) intravenosamente.	Artritis reumatoide	Fase 1	Detectaron niveles elevados de sTWEAK en suero en pacientes con Artritis Reumatoide	NCT00771329
<i>Biogen</i>	BIIB023 (Anti-TWEAK)	Atrofia Muscular	Fase 1	Detectaron niveles elevados de sTWEAK en suero en pacientes con Atrofia Muscular	NCT01943513
<i>Hoffmann-La Roche</i>	RO5458640 (anti-TWEAK)	Cáncer sólido	Fase 1	RO5458640 se une a sTWEAK y evita la unión con Fn14	NCT01383733
<i>Abbott</i>	PD1192 (Anti-Fn14).	Cáncer sólido	Fase 1	Bloquea Fn14	NCT00738764
<i>Biogen</i>	BIIB023 (Anti-TWEAK)	Cáncer sólido	Pre-Clínica	La unión de BIIB023 con sTWEAK evita su función al interaccionar con Fn14	(182)
<i>UHW/arGEN-X</i>	18D1 (Anti-Fn14)	Cáncer de colon	Pre Clínica	La unión de 18D1 a Fn14 evita la interacción TWEAK-Fn14	(183)
<i>KAHR Medical</i>	KAHR-101 (Fn14-TRAIL)	Cáncer hepatocelular	Pre-Clínica	La fusión de Fn14 con TRAIL evita la unión de TWEAK.	(184)

Tabla 9 – Ensayos clínicos activos cuya diana terapéutica es el eje TWEAK/Fn14. Fuente: *ClinicalTrials.gov*.
Abreviaciones: PTX3, Pentraxina 3; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

2.7 Niveles circulantes de TWEAK y sus receptores como posibles biomarcadores en diferentes patologías

El interés por la búsqueda y el uso clínico de nuevos biomarcadores que pronostiquen, diagnostiquen y/o monitoricen la evolución de cualquier patología ha aumentado en los últimos años. Un biomarcador ideal debe tener altos coeficientes de sensibilidad y especificidad; fácil de obtener, económico y reproducible de medir y debe haber suficiente evidencia científica que sugiera que la modificación de los niveles de dicho biomarcador influye en el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Como se comentó en apartados anteriores, tanto TWEAK como sus receptores se expresan en la membrana celular pero pueden sufrir cortes proteolíticos y ser liberados al medio extracelular en su forma soluble (92). Este hecho ha llevado a la comunidad científica a estudiar el posible uso de TWEAK y sus receptores como marcadores de pronóstico y diagnóstico de diferentes patologías.

En la Tabla 10 se detallan los estudios de posible uso de TWEAK/Fn14/CD163 como biomarcadores en diferentes patologías

Introducción - Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Patología	TWEAK/Fn14/CD163	Biofluido/tejido de origen	Niveles	Diagnóstico	Pronóstico	Monitorización	Referencia
Cáncer de Próstata	TWEAK/Fn14	Semen/Pellet Semen	↑/↓		X		(185)
Nefropatía diabética	Fn14	Orina	↑	X			(105)
Infarto de miocardio	TWEAK	Suero	↑		X		(186)
Enfermedad de las arterias periféricas	CD163	Plasma	↑		X		(187)
Insuficiencia cardíaca	TWEAK	Plasma	↓		X		(188)
Diabetes T2	TWEAK/CD163	Suero	↓		X		(189)
Obesidad mórbida	TWEAK	Suero	↓	X		X	(97)
Aneurisma abdominal	TWEAK	Plasma	↓		X		(190)
Esteatosis Hepática	TWEAK	Suero	↓	X	X		(191)
Cáncer de cabeza y cuello	TWEAK	Suero	↓	X			(192,193)
Esclerosis Múltiple	TWEAK	Suero	↑		X		(194)
Ictus	TWEAK/Fn14	Suero/muestras de cerebro	↑	X			(195)
Estenosis carotídea	TWEAK	Sobrenadante de placas carotídeas humanas in vitro	↓	X			(196)
Fallo renal	CD163	Suero	↑		X		(197)
Diabetes gestacional	TWEAK	Plasma	↓	X			(198)
Hipertensión	TWEAK	Plasma	↓	X			(199)
Síndrome de lipodistrofia relacionado con VIH-1	TWEAK	Suero	↓	X		X	(200)
Leucemia mieloide aguda	CD163	Suero	↑	X	X		(123)
Lupus nefrítico	TWEAK	Orina	↑	X			(201)
Enfermedad de Gaucher	CD163	Plasma		X		X	(202)
Artritis Reumatoide temprana	TWEAK/CD163	Suero	↑	X			(203)
Pancreatitis aguda	TWEAK	Suero	↑	X	X		(204)
Glioma	Fn14	Biopsia de glioma	↑		X		(205)

Tabla 10 - Utilidad clínica como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de la patología de TWEAK y sus receptores, Fn14 y CD163

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-microRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

3. Vesículas Extracelulares y exo-microRNAs

Las células se comunican entre ellas para un buen desarrollo fisiológico y funcional, lo que conlleva a la modulación de diferentes procesos tales como la supervivencia, migración, proliferación o la diferenciación celular (206,207). La comunicación celular se establece mediante uniones directas célula-célula (*gap junctions*) (208), nanotubos de membrana o citonemas (209) o a través de factores solubles que pueden actuar de manera autocrina, paracrina o endocrina (210). En este sentido, en la última década, ha emergido un nuevo sistema de comunicación celular basado en vesículas extracelulares (VEs).

Las VEs fueron descritas en 1967 por Peter Wolf. Observó que las plaquetas secretaban partículas ricas en lípidos con actividad procoagulante (211). A partir de entonces, se fueron detectando VEs en diferentes biofluidos (fluidos biológicos) como sangre (212), orina (213), saliva (214), líquido cefalorraquídeo (215) o semen (216) entre otros.

Las VEs reciben diferentes nombres que hacen referencia a su tamaño y/o a su presencia fuera de la célula. En la tabla 11 se recogen características de los 3 tipos principales de VEs.

Tipos	Exosomas	Microvesículas	Cuerpos Apoptóticos
Características			
Tamaño	30nm - 150nm (217).	100nm-1000nm (218).	≥1000 nm (218).
Origen	Fusión de los MVBs con la membrana plasmática (219).	Gemación de la membrana plasmática (218).	Invaginación de la membrana plasmática y fragmentación celular (220).
Densidad	1,10-1,18 g/ml (217).	1,25-1,30 g/ml (218).	1,16-1,28 g/ml (218).
Forma	Esféricos y alargados (221).	Irregulares (222).	Heterogénea (220).
Velocidad de sedimentación por Ultracentrifugación	120000 xg - 70 minutos (223)	12000 xg - 40 minutos (223)	2000 xg - 20 minutos (223)
Marcadores de identificación	Tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), Proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90), ALIX, TSG101, Anexinas, integrinas, frottilinas, Rab, MHC, (219)	Fosfatidilserina, CD40, colesterol integrinas/selectina, <i>factor de ribosilación ADP 6</i> (218)	Fosfatidilserina, anexina V, trombospodina, C3b, histonas, orgánulos, ADN genómico (218)

Abreviaciones: nm: nanómetros; MVBs: cuerpos multivesiculares; g: gramos; ml: mililitros; xg: fuerza g; **CD9:** tetraspanina 9; **CD63:** *Lysosome Associated Membrane Protein 3*; **CD81:** tetraspanina 28; **CD82:** tetraspanina 27; **HSP:** Proteínas de choque térmico; **ALIX:** *Apoptosis-Linked Gene 2-Interacting Protein X*; **TSG101:** *Tumor susceptibility gene 101*; **MHC:** Complejos mayores de histocompatibilidad; **CD40:** Cluster de diferenciación 40; **ADP:** Adenosina difosfato; **ADN:** ácido desoxiribonucleico.

Tabla 11 - Características de las distintas VEs

Los **exosomas**, llamadas así desde 1987 por Johnstone *et al.* (224), son vesículas esféricas endosomales delimitadas por una bicapa lipídica entre 30 y 150 nm de diámetro que se originan a partir de varias invaginaciones de la membrana plasmática y son secretadas por la mayoría de

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-microRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

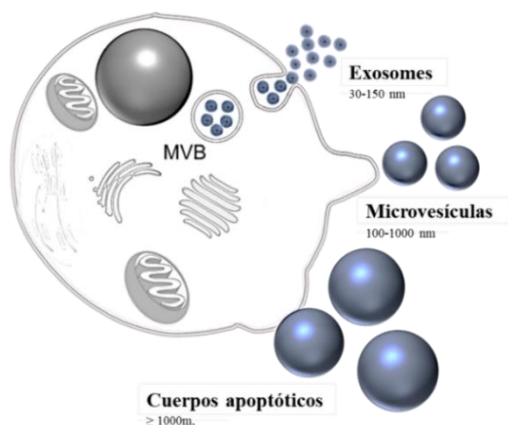


Figura 14 - Representación esquemática de las vesículas extracelulares, incluidos exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Fuente: Adaptada de <http://everzom.com/extracellular-vesicles/>. Abreviaciones: MVB: Cuerpo multivesicular

células hacia el medio extracelular después de la fusión de cuerpos multivesiculares (MVBs) con la membrana plasmática (225). Pueden participar en procesos fisiológicos y patológicos al transferir información a otras células (219) (Figura 14).

En 1981 Trams *et al.*, detectaron los exosomas por microscopía electrónica (226) y, en 1983, Rose M. Johnstone & C. Harding, estudiando la maduración de reticulocitos a eritrocitos, observaron que receptores de transferrina estaban asociados con vesículas de aproximadamente 50 nm que eran expulsadas al espacio extracelular (227,228).

Los exosomas pueden ser identificados por la presencia de proteínas en su superficie tales como la tetraspanina 27 (CD82), tetraspanina 28 (CD81) tetraspanina 29 (CD9) o *Lysosome Associated Membrane Protein 3* (CD63), proteínas necesarias para el transporte y fusión de membranas (integrinas, anexinas, frotilinas), proteínas relacionadas con los componentes internos de los endosomas *Apoptosis-Linked Gene 2-Interacting Protein X* (ALIX), receptores de transferrina y moléculas de adhesión celular (CAMs) (219). Se han descrito diferentes técnicas para poder aislarlos y purificarlos en los distintos fluidos según sus características. Dichas técnicas se detallan en la Tabla 12.

Técnica de aislamiento	Descripción	Referencia
Ultracentrifugación	Separación secuencial por la densidad y el tamaño, mediante la utilización de ultracentrífugas	(229)
Basado en el tamaño	Aislar basado en el tamaño de las vesículas.	(229,230)
Precipitación	Inmovilización de moléculas de agua que precipita los componentes menos solubles	(229)
Afinidad	Uso de anticuerpos de proteínas específicas que se encuentran en la superficie de la membrana exosomal (CD9, CD63, CD81, CD82, ALIX, anexinas o CAMs), para capturar específicamente VEs.	(219,229)

Tabla 12 – Descripción de las diferentes técnicas que se usan para el aislamiento de VEs

Por orden de tamaño le siguen las **microvesículas** (Figura 14). Son un grupo heterogéneo de vesículas con diámetros que oscilan entre los 100 y 1000 nm, con una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml e irregulares. Son liberadas hacia el exterior a partir de gemación de la membrana. A diferencia de los exosomas, se han propuesto pocos marcadores específicos para su identificación, entre ellos la fosfatidilserina, el factor de ribosilación adenosina difosfato 6, algunas integrinas y selectinas y el *cluster* de diferenciación 40 (218).

Finalmente, los **cuerpos apoptóticos** (Figura 14), descritos por primera vez en 1974 por Kerr *et al.*, Son estructuras en forma de vesículas con un diámetro entre 1000 y 4000 nm y una densidad entre 1,16 y 1,28 g/ml, que se forman a partir de invaginaciones de la membrana plasmática

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-microRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

durante el proceso de muerte celular. Presentan un alto contenido en fosfatidilserina, anexina V, trombospodina y C3b (proteína que participa en el sistema del complemento) en la membrana vesicular (218).

3.1 Biogénesis, transporte, secreción e internalización de VEs

3.1.1 Biogénesis

La biogénesis exosomal se inicia mediante la formación de endosomas tempranos, a partir de la invaginación de la membrana plasmática (231) (Figura 15). Posteriormente, dichos endosomas maduran hacia endosomas tardíos. Durante la maduración, se modifica su estructura y se produce una segunda invaginación de la membrana endosómica, dentro del citoplasma celular, y escisión para formar vesículas intraluminales (ILVs) que una vez liberados al espacio extracelular, serán denominados VEs (232) (Figura 15). El conjunto formado por el endosoma tardío, junto con las ILVs, se le conoce como MVBs (219).

Los MVBs pueden dirigirse hacia su degradación mediante su fusión con los lisosomas (ruta degradativa) o bien fusionarse con la membrana plasmática y liberar las ILVs hacia el espacio extracelular en respuesta a diferentes estímulos (ruta secretora) (Figura 15) (219,231,233). La formación de las ILVs puede ser dirigida por la maquinaria del complejo *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT). Este complejo ESCRT, está compuesto por alrededor de 30 proteínas diferentes agrupadas en 4 complejos (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III) que trabajan cooperativamente facilitando la formación de MVBs (234).

3.1.2 Transporte

El transporte de los MVBs hacia la membrana plasmática se produce por interacciones con actina y los microtúbulos del citoesqueleto celular mediante la regulación de las Rab GTPasas, aunque el mecanismo preciso no se conoce (235,236).

3.1.3 Secreción

Inicialmente se postuló que la secreción comportaba la eliminación de componentes celulares tóxicos, proteínas, moléculas y desechos metabólicos de las células (224). El avance en la investigación ha vislumbrado nuevas funciones estrictamente reguladas, como la comunicación de célula a célula, la modulación de la respuesta inmune o la reparación de tejidos, entre otros (219,237,238). Además de dichas funciones fisiológicas, las VEs se han descrito implicadas en diversos procesos patológicos como infecciones, enfermedades neurodegenerativas y en cáncer (239). Por lo tanto, el estado biológico de la célula condiciona la secreción de VEs.

La fusión de los MVBs en la membrana plasmática para la secreción del contenido en el espacio extracelular está mediada principalmente por interacciones proteína-lípido y lípido-lípido (240).

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-microRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Además, se sabe que diferentes moléculas, complejos proteicos y procesos están también involucrados en la secreción de VEs. Las proteínas *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment proteins Receptors* (SNAREs) facilitan la fusión de las vesículas a la membrana (Figura 15) (241). La acción del Ca^{2+} también podría tener un papel relevante en la secreción de VEs. El aumento de los niveles Ca^{2+} intracelular después del tratamiento con monensina (antibiótico políter aislado de *Streptomyces cinnamonensis*) en células K562 aumentó la secreción (242).

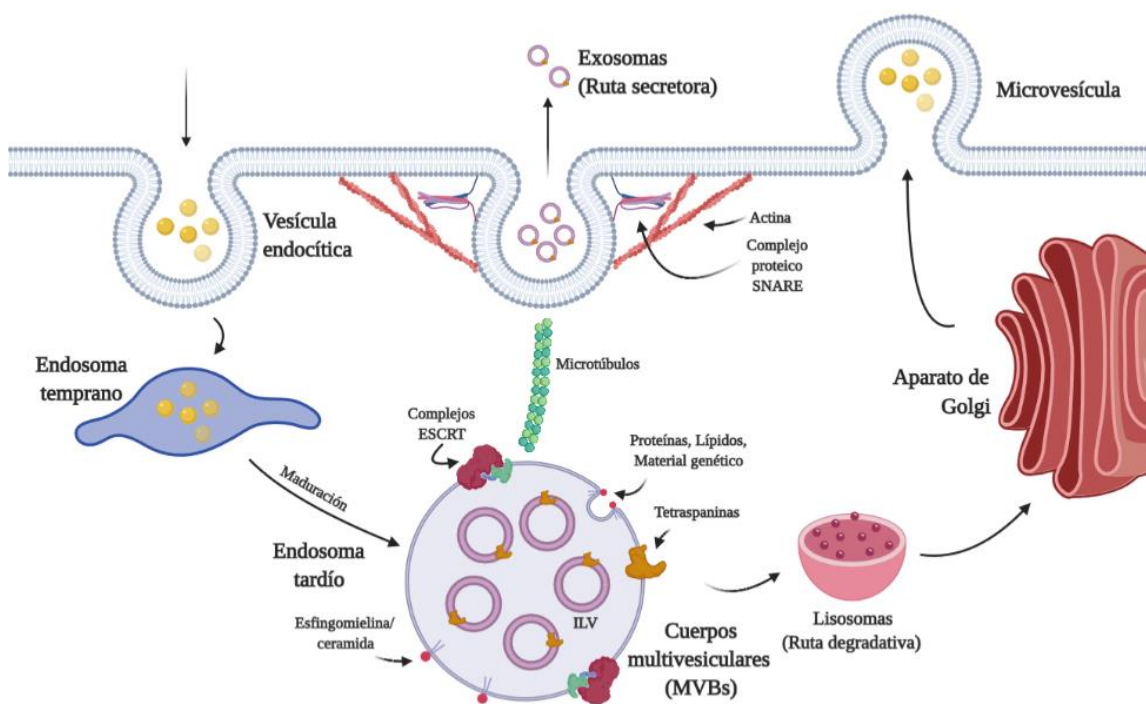


Figura 15 - Representación esquemática de la biogénesis y secreción de VEs. Adaptado de Cruz De los Santos (243). Creado con BioRender.com **Abreviaciones:** MVBs, Cuerpos multivesiculares; ILV, vesículas intraluminales; ESCRT, Endosomal Sorting Complex Required for Transport; SNARE, Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment proteins Receptor.

3.1.3.1 Estímulos secretores

Se han descrito diferentes estímulos relacionados con un incremento en la secreción de VEs por parte de las células. Entre los estímulos relacionados con el con cáncer encontramos la hipoxia, la inflamación o el estrés oxidativo, entre otros (244).

La **hipoxia**, o deficiencia de oxígeno, está comúnmente involucrada en los tumores sólidos, contribuyendo a la progresión tumoral y a la falta de respuesta a la radioterapia y quimioterapia, provocando un incremento en la probabilidad de recurrencia del tumor (245). El factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) es el mayor regulador de la adaptación del tumor a la hipoxia. En condiciones hipóxicas, la degradación de HIF-1 α está inhibida, lo que conduce a la expresión de genes implicados involucrados en proliferación, metabolismo, angiogénesis o metástasis (245). En este sentido, la hipoxia está directamente relacionada con un aumento de la secreción de VEs.

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-microRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Estudios realizados en líneas celulares de CaP mostraron un aumento de liberación de VEs bajo condiciones de hipoxia (246). Lo que podría indicar que la hipoxia podría tener un papel relevante en la biogénesis y secreción de VEs y, en el desarrollo del CaP.

La **inflamación** es otro factor que se ha relacionado estrechamente con la secreción de VEs y con el desarrollo del cáncer. La inflamación es un proceso orquestado entre las células cancerosas, estromales e inmunes generándose un microambiente que favorece el desarrollo del cáncer (Figura 16) (247).

Los daños celulares causados por una lesión o infección activan la producción de citocinas inflamatorias por las células inmunes y la proliferación de células epiteliales para reparar la lesión infligida y volver al estado normal de homeostasis. Sin embargo, si la alteración es causada por un evento oncogénico, la inmunidad no puede resolver el problema, favoreciendo el crecimiento del tumor (Figura 16) (247).

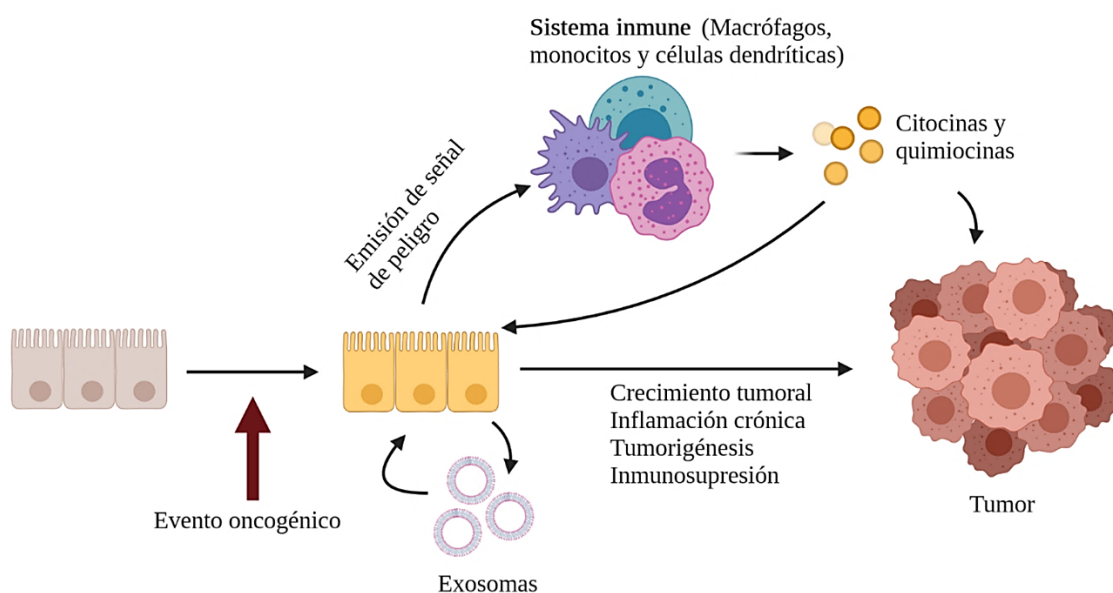


Figura 16 – Representación gráfica del papel de la inflamación crónica en el desarrollo del tumor por la acción de citocinas y quimiocina, mediante la secreción de VEs. Fuente: Adaptado de Greten FR (450). Creado con BioRender.com

Las citocinas, las quimiocinas o los factores de crecimiento liberados por las células inmunes tienen un efecto directo sobre las células premalignas y cancerosas, promoviendo el crecimiento y la progresión del tumor. Puesto que los VEs tienen un papel relevante en la supresión de la respuesta inmune y el intercambio de información entre células reprogramando el metabolismo y la señalización celular, cabe esperar que dichas moléculas inflamatorias pueden inducir la biogénesis y secreción de VEs (Figura 16).

Gao et al. estudiaron el efecto que tiene sobre los VEs el estímulo de lipopolisacáridos (LPS) sobre células dendríticas. Mediante el análisis de la proteína de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) demostraron que el LPS aumenta la secreción de VEs (248). También se ha observado

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-microRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

en diferentes estudios en adipocitos y células adiposas mesenquimales que la presencia de citoquinas y quimiocinas, como TNF α o INF- γ induce la secreción de VEs y, pueden modificar la composición interna, enriqueciendo en miR-125a-5p o miR-16-5p (249–251) y pueden ser capaces de cambiar el fenotipo celular de macrófagos M1 a M2 (250).

El **estrés oxidativo** se basa en el desequilibrio, por parte de la cadena respiratoria mitocondrial, de especies reactivas de oxígeno (ROS). La desregulación de la producción de ROS conduce al daño de biomoléculas y células, jugando un papel relevante en el inicio o la progresión de numerosos trastornos, como la aterosclerosis, la neurodegeneración y el cáncer (252). Para proteger al organismo contra estos eventos dañinos, existe un complejo formado por antioxidantes enzimáticos (como por ejemplo la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa, catalasa) y antioxidantes no enzimáticos (Glutatión (GSH), vitaminas C y D) (253).

Por lo que respecta a las VEs, las células tumorales y senescentes producen un mayor número de VEs, y ambas tienen niveles elevados de ROS, que pueden ser liberados en condiciones de estrés oxidativo por las VEs y alterar los mecanismos de defensa de las células receptoras (244). Concretamente, se ha observado que VEs derivados de tumor adenocarcinoma pancreático, colorectal y de pulmón pueden inducir citotoxicidad en monocitos (254).

3.1.4 Internalización

Las VEs juegan un papel relevante en la comunicación celular. Tienen que interactuar con las células dianas e internalizarse, liberando su contenido (carga). Se han propuesto diferentes mecanismos de entrada de las VEs en las células diana, siendo un tema en continuo estudio. Las interacciones proteicas se han relacionado con la facilitación de la endocitosis en las células diana. Se observó que el tratamiento con proteinasa K sobre las VEs reducía su captación por las células (255). También se han relacionado las tetraspaninas, las lectinas o las integrinas de la membrana exosomal con la captación (256). Por otro lado, la fusión de las VEs con la membrana plasmática y posterior liberación del cargo dentro de la célula diana se ha descrito como vía de captación de VEs (257).

La endocitosis puede ser regulada por clatrina y caveolina en la superficie de la membrana endocítica, por macropinocitosis, fagocitosis o por receptores proteicos en áreas ricas en esfingolípidos (256). Una vez en el interior, podrían experimentar transcitosis (es el transporte de materiales desde un lado del espacio extracelular al otro lado) y volver a ser liberados al espacio extracelular, o ser degradados por los lisosomas (257).

Los mecanismos de internalización de las VEs no son sólo dependientes de su composición, sino también del estatus metabólico de la célula diana. Así pues, la internalización exosomal por las

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-microRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

células diana puede estar regulada por diferentes factores, cómo el pH celular y el exosomal, la capacidad fagocítica o endocítica de la célula receptora o incluso el propio contenido exosomal (258).

3.2 Composición de las VEs

Las VEs transportan tanto en la membrana como en su interior, gran variedad de moléculas bioactivas como proteínas, lípidos y diversos tipos de material genético, según la población celular de la cual provengan y la condición fisiológica y patológica en que se encuentre la célula que los secreta. Los datos obtenidos sobre la composición de las VEs se recogen en diferentes bases de datos de libre acceso como “ExoCarta” (www.exocarta.org).

Principalmente, el cargo de las VEs está compuesto por:

3.2.1 Proteínas

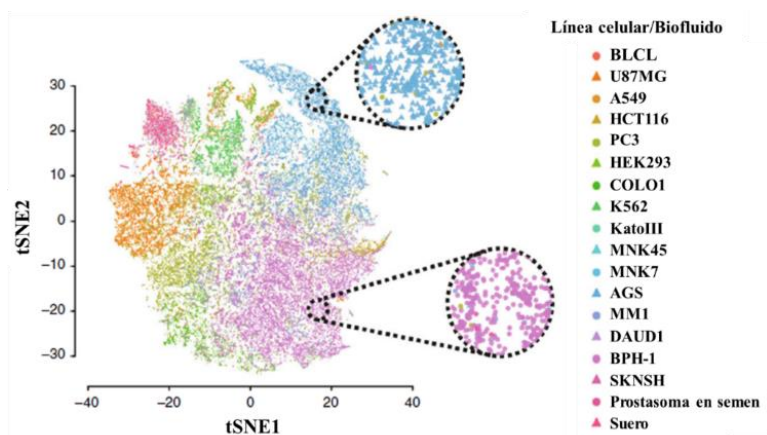


Figura 17 - Representación del perfil proteico exosomal de diferentes sobrenadantes celulares y biofluidos humanos mediante la identificación de 3 proteínas de superficie visualizados por el método T-distributed Stochastic Neighbor Embedding (tSNE). La representación sugiere que, a partir de la identificación de 3 proteínas de superficie, es posible discriminar VEs de diferentes fuentes. El color y la forma de los símbolos representan la fuente de cada exosoma. Fuente: Adaptado de Wu D et al (259).

Las proteínas son uno de los principales componentes de la superficie de las VEs y se utilizan como marcadores exosómicos. Entre ellas destacan: las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y CD82 o moléculas responsables de la adhesión celular como

CAMs. Pero, además, en el interior de las VEs se ha observado que transportan moléculas que participan en la traducción de señales

como son HSP70 y HSP90; proteínas que participan en la liberación de VEs como ALIX y TSG101 o, proteínas responsables del transporte y fusión con la membrana como anexinas o proteínas de la familia de las proteínas Rab GTPasas (233,238). Otras proteínas que destacan en las VEs, y que pueden diferir según el tipo celular, son enzimas metabólicas, proteínas traductoras de señales, citocinas y quimiocinas; y diferentes proteínas relacionadas con la adhesión celular. Además, las VEs secretados por células presentadoras de antígenos presentan en su superficie proteínas MHC-I y MHC-II capaces de modular la respuesta inmune (219).

Recientemente, Wu et al. estudiaron la composición proteica exosomal de sobrenadantes de cultivos celulares o de fluidos humanos. Demostraron que las VEs de diferentes fuentes se pueden

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-microRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

distinguir mejor cuando se identifican 3 o más proteínas de superficie. Así pues, pusieron de manifiesto que el perfil proteico de las VEs varía según el origen y la condición fisiológica de la célula (Figura 17) (259).

3.2.2 Lípidos

Los lípidos participan en el reconocimiento e internalización por parte de la célula diana (260). La membrana exosomal está enriquecida en esfingomielinina, ceramida, colesterol, ácido grasos, prostaglandinas, leucotrienos y fosfatidilserina (231). Los ácidos grasos, como el ácido araquidónico, pueden interactuar con receptores de transferencia de lípidos citosólicos como FABP y PPAR γ , modulando el metabolismo lipídico de la célula diana (261). Además, las prostaglandinas presentes en las VEs pueden activar diversas respuestas biológicas (262). La Figura 18 ilustra un estudio de las diferencias en la composición lipídica entre la membrana celular y la exosomal de la línea celular prostática PC-3.

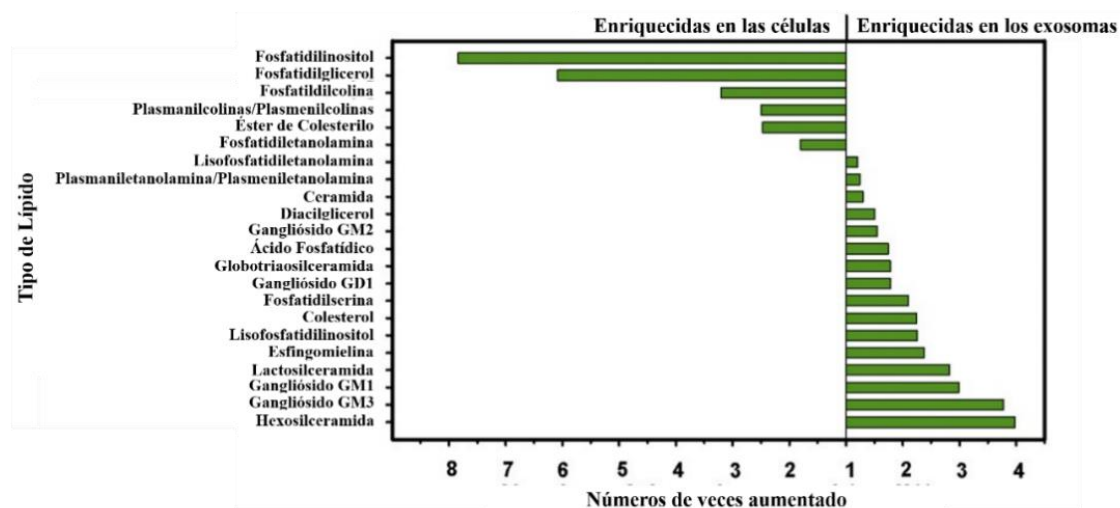


Figura 18 – Enriquecimiento lipídico de la membrana celular y exosomal de la línea celular epitelial prostática PC-3. Fuente: Adaptada de Skotland, T. et al. (263)

3.2.3. Ácidos Nucleicos

El hallazgo de ácidos nucleicos en el interior de las VEs fue en 2007, cuando Valadi *et al.* mediante *microarrays* de ARN en mastocitos, mostraron por primera vez que las VEs portaban material genético en su interior. Revelaron la presencia de ARN de aproximadamente 1300 genes, algunos eran *microRNAs* (miRNAs) como let-7, miR- 1 o miR-375 entre otros, muchos de los cuales no estaban presentes en el citoplasma de la célula donante. A posteriori, mediante experimentos *in vitro* demostraron que los ARN de las VEs eran funcionales, capaces de provocar cambios en el comportamiento de las células diana. (262).

En general, las VEs pueden transportar todas las especies de ARN de la célula: ARNm, miRNAs, ARN de cadena larga no codificante (lncARN), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ARN nuclear pequeño (ARNsn), ARN nucleolar pequeño (ARNsno), Y-ARN, ARN

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-microRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

pequeño derivado de transferencia (ARNts), ARN asociado a Piwi (subfamilia de proteínas de la familia Argonauta) (ARNpi) y ARN condicional pequeño (ARNsc) (264,265) (Figura 19).

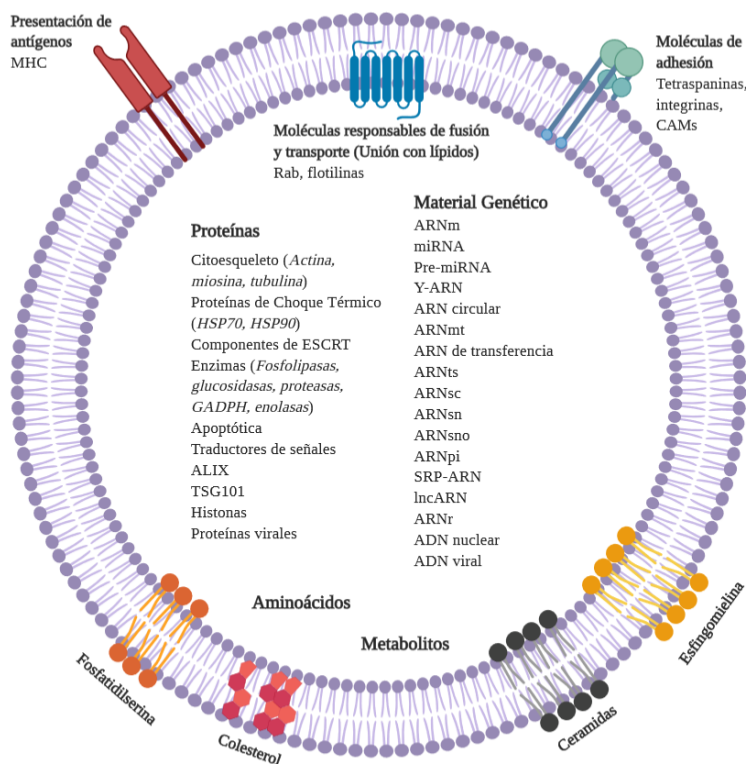


Figura 19 - **Composición de las VEs y su carga.** Imagen esquemática indicando, en la superficie, los lípidos y proteínas que componen la membrana y en el interior se listan las proteínas y diferentes moléculas de ácidos nucleicos que se han descrito hasta la fecha. Creado con BioRender.com **Abreviaciones:** **MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad, **ESCRT:** Endosomal Sorting Complex Required for Transport, **ADN:** ácido desoxirribonucleico, **ARN:** ácido ribonucleico; **GADPH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; **ALIX:** Apoptosis-Linked Gene 2-Interacting Protein X; **TSG101:** Tumor susceptibility gene 101; **ARNm:** ARN mensajero; **miRNA:** microRNA; **Pre-miRNA:** microRNA premaduro; **ARNmt:** ARN mitocondrial; **ARNts:** ARN pequeño derivado de transferencia; **ARNsc:** ARN condicional pequeño; **ARNsn:** ARN pequeño nuclear; **ARNsno:** ARN pequeño nucleolar; **ARNpi:** ARNs asociados a Piwi; **SRP-ARN:** ARN de la partícula de reconocimiento de señal; **lncARN:** ARN de cadena larga no codificante; **ARNr:** ARN ribosomal; **CAMs:** Moléculas de adhesión celular.

La distribución de ARN dentro de las VEs depende del origen, estímulo y condición fisiológica celular. La diversidad de estos ARNs, puede atribuirse a diferencias en la fuente de las VEs, o incluso pueden reflejar variaciones en la preparación de muestras, métodos de purificación de VEs y ARN, técnicas de estudio de ARN o incluso plataforma de secuenciación utilizada (265).

De los derivados de ARN, los miRNAs son los más abundantes en las VEs (266). Los miRNAs tienen un papel relevante en la regulación genética mediante la ruta de ribointerferencia, y las VEs son considerados un importante mecanismo de comunicación celular, capaces de modificar el comportamiento celular a través de su carga de miRNAs. Este hecho se ha relacionado con diferentes patologías neurodegenerativas, inflamatorias e incluso cáncer (219).

Estudios recientes han demostrado además la presencia de ADN en VEs, tanto nuclear como mitocondrial (Figura 19) (267).

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-miRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

3.3 miRNAs exosomales.

3.3.1 Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs son cadenas de ARN cortas de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos, no codificante y altamente conservadas, cuya función es regular la expresión génica, ya sea reprimiendo la translación (complementariedad parcial) o permitiendo la degradación de ARNm (complementariedad perfecta) uniéndose a las regiones 3' *untranslated region* (UTR) mediante las proteínas Argonauta (AGO), que las guía hacia las secuencias complementarias. Este proceso es esencial para el desarrollo animal, la diferenciación celular y la homeostasis (268).

La primera vez que se demostró la presencia de miRNAs fue en 1993 por *Ambros et al.* Observaron en *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) que el gen Lin-4 codifica para dos ARNs (269). No fue hasta el año 2000 cuando encontraron otro miRNA (miRNA let-7) cuyo gen codificante tenía homología con genes humanos (270). Sin embargo, fue en 2001 cuando se utilizó por primera vez la palabra “miRNA” (271).

En el núcleo celular, el gen que contiene los miRNAs (los cuales pueden compartir gen y loci con otros miRNAs y formar *clusters* (272)) son transcritos por la ARN Polimerasa II en Pri-miRNA (273,274). En ocasiones, los Pri-miRNA pueden sufrir modificaciones en su estructura nucleica mediante la enzima *RNA-specific adenosine deaminase* (ADAR). Esta variación puede modificar la funcionalidad del miRNA (275) (Figura 20).

Posteriormente, se une al complejo formado por la endoribonucleasa III Droscha, que reconoce la doble cadena y se une a la base de la horquilla que forma el microRNA primario (Pri-miRNA), y el gen 8 de la Región crítica del síndrome de DiGeorge (DGCR8) uniéndose en el tallo y asegura la correcta escisión formando el microRNA prematuro (pre-miRNA) (276,277). La unión inadecuada del complejo Droscha-DGCR8 y pri-miRNA puede formar también isomiRs que afectan la maduración, la estabilidad, la actividad y la diana del microRNA (278) (Figura 20).

La Exportin 5 (XPO5) transporta, dependiente a Ran-Guanosin Trifosfato (GTP), el Pre-miRNA por el poro nuclear hacia el citoplasma (279). A pesar de ello, diferentes estudios indican que hay vías alternativas a XPO5 de transporte que permita al Pre-miRNA pasar del núcleo al citoplasma (280). Una vez en el citoplasma, la proteína Dicer junto con la *trans-activation response RNA-binding protein* (TARBP) y *protein activator of kinase protein R* (PACT) reconoce el pre-miRNA (281). El producto final que se obtiene es el miRNA maduro formado por dos cadenas complementarias, una de las cuales tienen más potencial de actuar. Para ello necesita de las proteínas AGO que formará el complejo llamado *miRNA-induced silencing complex* (miRISC), que la dirigirá hasta el sitio 3'UTR del ARNm diana, truncando su traducción y, por lo tanto, la expresión proteica (282) (Figura 20).

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

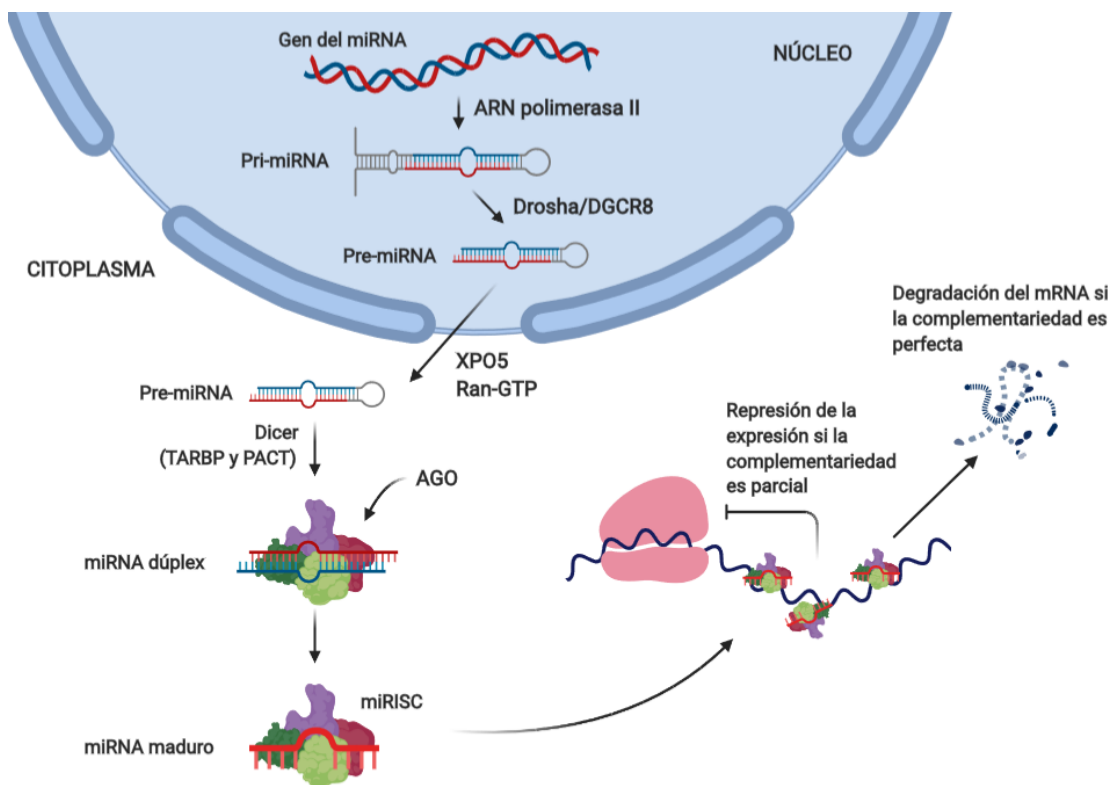


Figura 20 - **Biogénesis de los miRNAs.** La biogénesis de miRNA se inicia con la generación de la transcripción pri-miRNA. El complejo compuesto por DGCR8, escinde el pri-miRNA para producir el precursor-miRNA (pre-miRNA). El pre-miRNA se exporta al citoplasma de una manera dependiente de Exportin5 / RanGTP. Finalmente, las proteínas Argonaute (AGO) forman miRISC. En la mayoría de los casos, miRISC se une a los ARNm diana e inhibe su traducción a proteína. **Abreviaciones:** ARN: ácido ribonucleico; Pri-miRNA: microRNA primario; Pre-miRNA: microRNA premaduro, DGCR8: Gen 8 de la Región crítica del síndrome de DiGeorge; XPO5: Exportin 5; GTP: Guanosin Trifosfato; TARBP: Trans-activation response RNA-binding protein, PACT: Protein activator of PKR; AGO: Argonauta; miRISC: miRNA-induced silencing complex. **Fuente:** Adaptado de Cruz de los Santos et al. (243). Creado con BioRender.com

Además, los miRNAs pueden sufrir cambios post-transcripcionales como adenilaciones y urinilaciones en el extremo 3' gracias a la intervención de varias encimas que modulan la estabilidad y actividad del miRNAs (283).

3.3.2 Empaquetamiento de los microRNAs

El empaquetamiento de los miRNAs en el interior de las VEs es un sistema complejo que no está completamente dilucidado. Se postulan 4 mecanismos diferentes para el empaquetamiento de los exo-miRNAs (Figura 21).

El primer mecanismo que se reportó fue la vía de la esfingomielinasa 2 (nSMase 2). La nSMase 2 transforma la esfingomielina en ceramida. Dicho estudio observó que un aumento de la expresión de nSMase 2 en la membrana exosómica aumentaba la concentración de miRNA exosomales en el interior. Por otro lado, la inhibición de nSMase 2 disminuyó el cargo exosomal de miRNAs (284).

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

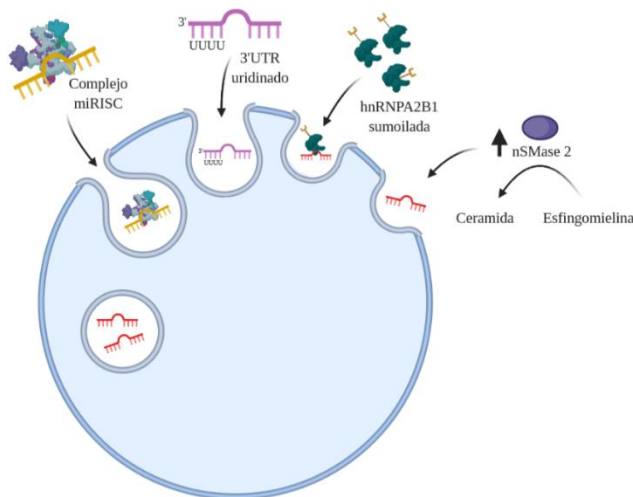


Figura 21 - Mecanismos postulados para la entrada de carga de microRNA en los VEs. Creado con BioRender.com. **Abreviaciones:** nSMase 2: Esfingomielinasa 2; hnRNPA2B1: Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2B1; 3'UTR: 3' untranslated región; miRISC: miRNA-induced silencing complex

En segundo lugar, se postuló la vía dependiente de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas sumoiladas con motivos de miRNA. Entre ellas destaca la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2B1 (hnRNPA2B1). Villaroya *et al.* observaron que hnRNPA2B1 reconoce una serie de secuencias (GGAG, UGAG, CCCU, y UCCU) del extremo 3' que poseen algunos miRNAs, hecho que sugieren que dichos miRNAs sean candidatos a entrar en los ILVs (285).

Además, la secuencia del extremo 3' puede tener un papel relevante en la entrada en los VEs. Koppers-Lalic *et al.* observaron mayor cantidad de miRNAs con una alta concentración en el extremo 3' de uracil en VEs comparado con el interior de las células B. Por el contrario, observaron una mayor cantidad miRNAs con una alta concentración en el extremo 3' de adenina en el interior celular de las células B comparado con los miRNAs exosomales (286).

Por último, se ha descrito que componentes proteicos del miRISC pueden modificar el cargo exosomal y bloquear la ruta degradativa de los MVBs (287).

3.3.3 Herramientas de predicción de dianas de miRNAs

La interacción entre los miRNAs y los ARNm diana se lleva a cabo a través de la región 3' UTR del ARNm mediante complementariedad de las bases nitrogenadas (288). En genética se denomina UTR a las regiones no traducidas de los genes. Al contrario de lo que ocurre con el emparejamiento entre ADN y ARN durante la transcripción, en la interacción entre un miRNA y su ARNm diana pueden existir bases que pueden quedar desemparejadas (Figura 22) (288).

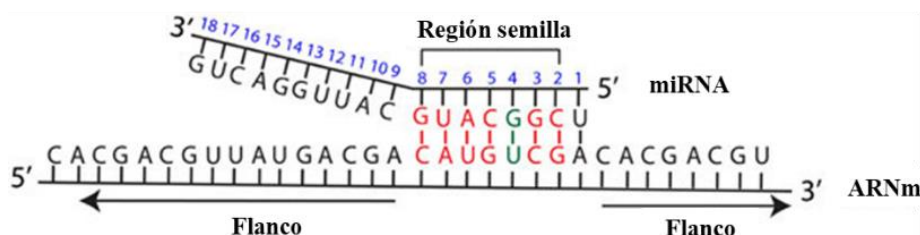


Figura 22 - Interacción miRNA:ARNm. Esquema modelo de la interacción miARN con su ARNm diana. Abreviaciones: miRNA: microRNA; ARNm: ARN mensajero

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

La zona de unión del acoplamiento entre el miRNA y su diana se conoce como región semilla. Esta región incluye de 6 a 8 nucleótidos en el extremo 5' de la hebra de miRNA y se caracteriza por ser la zona donde el acoplamiento se produce de forma complementaria (Figura 22).

Los algoritmos de predicción de dianas para miRNAs son herramientas informáticas cuyo objetivo es identificar la eficiencia de la interacción de los sitios de unión entre el miRNA y el ARNm, así como la estimación de la eficiencia de inhibición del ARNm diana, obteniendo un valor que se correlaciona con la probabilidad de inhibir la expresión del gen (289).

La estimación de dicho valor predictivo debe atender a las características del dúplex *miRNA:ARNm*: grado de complementariedad, energía libre de unión, contenido de repeticiones AU, accesibilidad de la estructura secundaria del miRNA, la abundancia de sitios de unión en el ARNm diana y el grado de conservación evolutiva de las secuencias que participan en dicha interacción (290).

La regulación de miRNA-ARNm, a menudo requiere diferentes miRNAs para actuar de manera cooperativa para regular un solo ARNm. Por otro lado, un solo miRNA también puede afectar el nivel de expresión de múltiples ARNm (291,292).

En la Tabla 13 se listan algunos de los algoritmos más utilizados en la predicción de dianas para miRNAs.

Herramienta de predicción	Complementariedad de la semilla	Conservación	Energía libre de la interacción miRNA:ARNm	Accesibilidad al sitio	Abundancia de sitios de unión
miRanda-mirSVR	X	X	X	X	
TargetScan	X	X			
DIANA-microT-CDS	X	X	X	X	X
MirTarget2	X	X	X	X	
RNA22-GUI	X		X		
TargetMiner	X	X	X	X	X
SVMicrO	X	X	X	X	X
PITA	X	X	X	X	X
RNAhybrid	X		X		X
miRWalk	X	X	X	X	X

Tabla 13 - **Herramientas de predicción de dianas de miRNAs.** En la primera columna se listan los diferentes algoritmos de predicción de dianas para miRNAs. Los algoritmos operan atendiendo a diferentes características que definen el potencial de la interacción miRNA-ARNm (indicado con una X se encuentran aquellas características que pueden ser determinadas con cada algoritmo). **Fuente:** Adaptado de Peterson et al.(288) . **Abreviaciones:** *miRNA*: microRNA; *ARNm*: ARN mensajero

Una vez que analizadas las interacciones mediante los algoritmos, dichas interacciones se deben validar experimentalmente. La validación experimental de dianas de miRNAs puede realizarse por diferentes métodos, detallados a continuación (293):

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-miRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- **Sobreexpresión transitoria de miRNAs artificiales:** Evalúa la acción represora del miRNA sobre los niveles de expresión endógenos del gen diana in vitro en cultivos celulares. Si la diana es real, su expresión se verá reducida (293).
- **Inhibición de miRNAs endógenos:** Evalúa la acción represora del miRNA sobre su diana inhibiendo la expresión del miRNA. Si la diana es real, la expresión del gen diana se verá aumentada (293).
- **Sobreexpresión transitoria de miRNAs artificiales en co-transfección con un sistema de expresión de luciferasa conjugada a la región 3'UTR del gen diana:** Permite la validación específica de los sitios de unión. El gen de interés se inserta *upstream* del gen de luciferasa en un plásmido, que es transfectado a las células. La cantidad de luz producido depende de la expresión del gen de interés. Cuanto menor sea la expresión del gen de interés por inhibición del miRNA, menor será la producción de luz (294).
- **Análisis de interacción miRNA-ARNm por *microarray*:** Aunque permite analizar numerosas interacciones, solo detecta cambios de expresión a nivel de ARNm, lo que puede conducir a probables falsos negativos (293).
- **Inmunoprecipitación y secuenciación de complejos proteína AGO-miRNA-ARNm (*HITS-CLIP*):** permite detectar interacciones entre el miRNA y su ARNm diana mediante el aislamiento de las interacciones AGO:miRNA, permitiendo caracterizar la interacción (295).

3.4 MicroRNAs encapsulados en VEs (Exo-miRNAs) y cáncer

En condiciones fisiológicas y patológicas, las VEs actúan como mensajeros celulares (240). La comunicación entre células mediada por VEs es crucial en el contexto del cáncer, ya que las células tumorales secretan constitutivamente una gran cantidad de VEs que pueden actuar autocrina, paracrina o endocrinamente (257). Tras la liberación de la carga exosomal en la célula receptora, los miRNAs encapsulados en VEs (*exo-miRNAs*) pueden regular la expresión génica (257). Así pues, los *exo-miRNAs* desempeñan funciones claves en la tumorigénesis, incluyendo proliferación, invasión, angiogénesis, la evasión de la apoptosis, metástasis y remodelación del microambiente tumoral, entre otros procesos oncogénicos (Figura 23) (296).

La primera evidencia que implicó los miRNAs con el cáncer fue por parte de *Calin et al.* Identificaron que el miR-15 y el miR-16 estaban inhibidos en pacientes con leucemia linfocítica crónica (297). A partir de entonces, el número de estudios que relacionan miRNAs con la patogénesis del cáncer ha ido aumentando considerablemente. El aumento del estudio del papel de las VEs y de los *exo-miRNAs* ha puesto en evidencia no solo la cooperatividad de diversos *exo-miRNAs*, sino que un solo *exomiRNA* puede modular diferentes procesos (296).

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

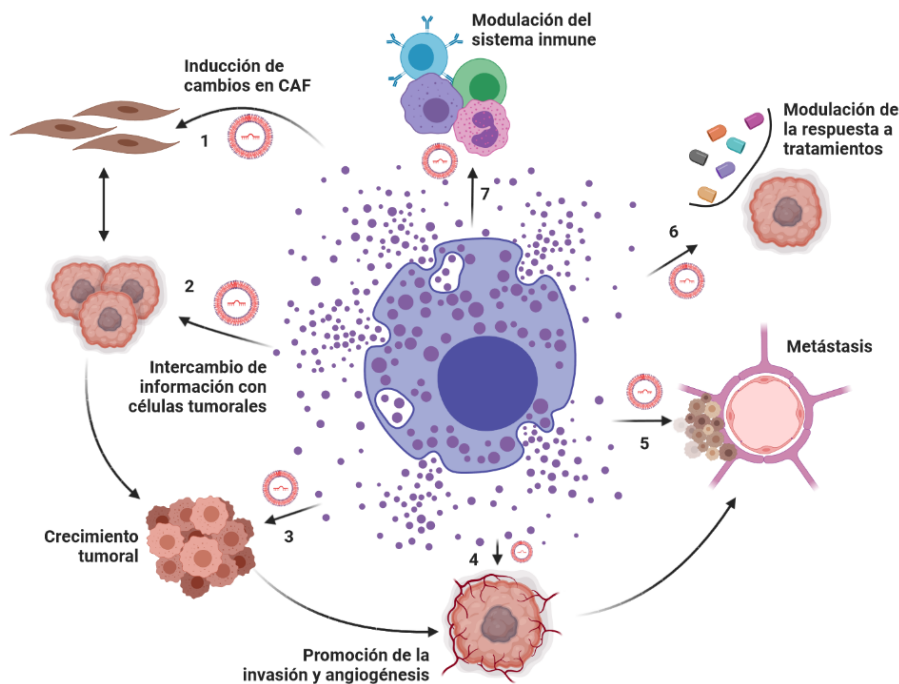


Figura 23 - Representación de las funciones de los exo-miRNAs en el contexto tumoral. Los exo-miRNAs son claves en la iniciación y desarrollo tumoral. Las células tumorales transfieren exo-miRNAs a los fibroblastos asociados a cáncer (1). En las células tumorales receptoras, los exo-miRNAs controlan la proliferación, la invasión y la metástasis (2 a 5). También sirven como mensajeros clave entre las células tumorales e inmunes, contribuyendo a la formación de un microambiente inmunosupresor que promueve el tumor y modula la respuesta a tratamientos (6 a 7). Adaptado de. Wang M et al. (298) Creado con BioRender.com. **Abreviaciones:** CAF: Fibroblastos asociados a cáncer

Las siguientes tablas se centran únicamente en exo-miRNAs que han sido aislados en biofluidos humanos. En la Tabla 14 se listan estudios que demuestran la implicación de los exo-miRNAs en procesos cancerígenos.

Tipo de cáncer	exo-miRNAs	Origen/Receptor	Efecto celular observado	Referencia
Mama	exo-miR-19a	Astrocitos/MDA-MB-231	Actúa sobre PTEN en células metastásicas de cáncer de mama.	(299)
	exo-miR-105	MDA-MB-231/MCFDCIS	Disminuye las uniones estrechas en las células endoteliales, destruyendo la función barrera.	(300)
	exo-miR-181c	MDA-MB-231-luc-D3H2LN/MBT24-H	Promueve la destrucción de la barrera hematoencefálica a través de PDK1.	(301)
	Familia exo-miR-200	4T1, 67NR, y MCF10CA1a/4TO7	Aumenta la proliferación e invasión de las células receptoras.	(302)
	exo-miR-1246	MCF-7 y MDA-MB-231/MDA-MB-231	Promueve la proliferación y la migración de las células de cáncer de mama mediante la regulación de la ciclina G2.	(303)
	exo-miR-122	MCF10A/MCFDCIS	Aumenta la metástasis reprogramando el metabolismo glucídico.	(304)
Hígado	exo-miR-103	QGY-7703, HepG2, MHCC97H, LO2, HEK293T/HUVEC	Facilita la metástasis tumoral atenuando la integridad de las uniones estrechas.	(305)
	exo-miR-23a	HepG2/HUVEC	Induce la angiogénesis en las células endoteliales receptoras sobre SIRT1	(306)

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Ovario	Las familias exo-miR-200 y exo-let-7	OVCAR-3 y SKOV-3/ OVCAR-3 y SKOV-3	Aumenta de la actividad invasiva	(307)
Esófago	exo-miR-21	Plasma sanguíneo/ EC9706	Actúan sobre PDCD4, inhibiendo la ruta de señalización de JNK, y estimulando la migración y la invasión	(308)
Nasofaríngeo	exo-miR-23a	CNE1, CNE2, 5-8F, y 6-10B/CNE2 y HUVEC	Promueve el crecimiento, la migración y la angiogénesis al inhibir TSGA10	(309)
Glioblastoma	exo-miR-148a	T98G, HEK293/ T98G	Promueve la proliferación y metástasis al regular la expresión de CADM1	(310)
Gástrico	exo-miR-423-5p	SGC-7901, HGC-27, AGS, MKN-45, GES-1, 293T/ 293T	Promueve el crecimiento del cáncer y metástasis mediante la inhibición de SUFU	(311)
Melanoma	exo-miR-222	Me1007/Me1402	Promueve la proliferación, invasión y metástasis mediante la activación de la vía de PI3K/AKT	(312)
Pulmón	exo-miR-21	HBE/HBE	Induce el gen VEGF en células bronquiales a través de un de STAT3	(313)

Abreviaciones: **PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; **ZO-1:** Zonula occludens-1; **PDK1:** 3-fosfoinositida dependiente de la proteína quinasa-1; **Ve-Cad:** Cadherina 5; **HBGF-5:** factor de crecimiento de fibroblastos 5; **SIRT1:** sirtuina 1; **PDCD4:** Proteína 4 de muerte celular programada; **JNK:** Quinasas c-Jun N-terminal; **TSGA10:** Testis Specific 10; **CADM1:** Molécula de adhesión celular 1; **SUFU:** supresor de homólogo fusionado; **PI3K:** fosfoinositol 3-quinasas; **AKT:** Proteína Quinasa B; **VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular; **STAT3:** transductor de señal y activador de la transcripción 3; **eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial

Tabla 14 – Exo-miRNAs relacionados con procesos proliferativos, invasivos y metastásicos en diversos tipos tumorales

En la Tabla 15 se recogen estudios que relacionan el crecimiento y la progresión de los tumores con disfuncionalidades del sistema inmune.

Tipo de cáncer	exo-miRNAs	Origen/Receptor	Efecto celular <i>in vitro</i> observado	Referencia
Ovario	exo-miR-21 y -29a	HEK-293/HEK-293	Promueven crecimiento tumoral y metástasis al unirse a TLR8, activando NF-κB y liberando citocinas proinflamatorias	(314)
	exo-miR-222-3p	Skov3/Macrófagos	Regula la polarización de macrófagos a M2	(315)
Páncreas	exo-miR-203	PANC-1/monocitos	Regula la expresión de TLR4 y citocinas, inhibiendo la maduración de DC y la diferenciación de linfocitos Th1	(316)
	exo-miR-212-3p	PANC-1, SW1990, BxPC-3 y SGC-7901/ monocitos	Inhibe la expresión de RFXAP que a su vez disminuye la expresión de MHC	(317)
Nasofaríngeo	exo-miR-24-3p	TW03, C666, CNE2 y NP69/Monocitos	Impide la función de las células T impidiendo la expresión de FGF11	(318)
Neuroblastoma	exo-miR-21 y -155	SK-N-BE(2)/Monocitos	Se ha implicado la expresión de exo-miRNA-155 con TLR8 en monocitos humanos. miRNA-155 inhibe TERF1	(319)
Mama	exo-miR-223	Macrófagos/ HEK-293T	Promueve la invasión y proliferación del cáncer activando los macrófagos secreten IL-4 a través de la vía a través de la vía Mef2c-β-catenina	(320)
Pulmón	exo-miR-23a	NK-92/ NK-92	Funciona como un factor inmunosupresor, regulando la expresión de CD107a en las células <i>Natural Killer</i>	(321)

Abreviaciones: **TLR8:** Toll-like Receptor 8; **NF-κB:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; **Th1:** *T helper 1*; **RFXAP:** proteína reguladora asociada al factor X; **MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad; **FGF11:** factor de crecimiento de fibroblastos 11; **TERF1:** factor de unión a repeticiones teloméricas 1; **Mef2c:** *Myocyte Enhancer Factor 2C*

Tabla 15 - Exo-miRNAs relacionados con la modulación del sistema inmune en diversos tipos tumorales

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Teniendo en cuenta las funciones vitales que desempeñan los exo-miRNAs en el desarrollo del cáncer, diferentes estudios han demostrado que la resistencia a los medicamentos está estrechamente relacionada con los exo-miRNAs. En la Tabla 16 se listan estudios en los que se ha observado dicho efecto.

Tipo de Cáncer	exo-miRNAs	Fármaco	Efecto celular <i>in vitro</i> observado	Referencia
Pulmón	exo-miR-100-5p	Cisplatina	Actúa sobre mTOR en la línea celular A549	(322)
Gástrico	exo-miR-21	Cisplatina	Actúa sobre la vía PI3K/AKT y PTEN en la línea celular MFC.	(323)
	exo-miR-155-5p	Paclitaxel	Confiere resistencia en células MGC803	(324)
Hígado	exo-miR-32-5p	5-FU, OXA, Gemcitabina, Sorafenib,	Activa PI3K/AKT al suprimir PTEN en las líneas celulares Bel7402 y Bel/5-FU	(325)
	exo-miR-122	Sorafenib	Aumentan la quimiosensibilidad en HepG2 al reprimir la ciclina G1, ADAM10 y IGF1R	(326)
Páncreas	exo-miR-155	Gemcitabina	Tratamiento en PDAC reprime la traducción de TP53INP1.	(327)
	exo-miR-210	Gemcitabina	Actúa sobre el ciclo celular mediante mTOR en la línea celular BxPC-3	(328)
	exo-miR-365	Gemcitabina	Inhibe la respuesta al tratamiento en células PDAC	(329)
Ovario	exo-miR-21	Paclitaxel	Provoca resistencia mediante la regulación de APAF1 en las líneas celulares ováricas SKOV3 y OVCA432	(330)
	exo-miR-433	Paclitaxel	Resistencia mediante la represión de CDK6 en las líneas celulares ováricas A2780, PEO1 y PEO4	(331)
Mama	exo-miR-221 y -222	Tamoxifeno	Regulan CDKN1B y ER α y proporcionaban resistencia en la línea celular MCF-7.	(332)
	exo-miR-134	Fármacos anti-HSP 90	Reprime STAT5B, HSP90 y BCL2 en la línea celular Hs578T.	(333)
Cabeza y Cuello	exo-miR-196a	Cisplatino	Aumenta la resistencia mediante las dianas CDKN1B e ING5 en diferentes líneas celulares asociadas a fibroblastos	(334)

Abreviaciones; mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero; **TAM:** Macrófagos asociados a tumores; **PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa; **AKT:** Proteína quinasa B; **PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; **APAF1:** factor activador de peptidasa apoptótica 1; **CDK6:** proteína quinasa de división celular 6; **CDKN1B:** inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1B; **ER α :** receptor de estrógeno alfa; **TP53INP1:** proteína tumoral proteína p53 inducible nuclear 1; **ADAM10:** A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10; **IGF1R:** receptor del factor de crecimiento 1; **STAT5B:** transductor de señales y activador transcripcional 5B; **HSP:** Proteínas de choque térmico; **BCL2:** B-cell lymphoma 2; **ING5:** Inhibidor de la proteína de crecimiento 5

Tabla 16 - Exo-miRNAs relacionados con la quimioresistencia y quimiosensibilidad en diversos tipos tumorales

3.5 MicroRNAs exosomales como herramienta de diagnóstico y pronóstico del cáncer

En la búsqueda de biomarcadores en el contexto del cáncer, la biopsia líquida es una modalidad no invasiva muy prometedora para el diagnóstico y el pronóstico, ya que permite la evaluación de moléculas circulantes en diferentes fluidos biológicos (296).

El primer estudio sobre biopsia líquida aplicada en el diagnóstico del cáncer fue publicado en 1965. Gold *et. al* demostraron el uso de la sangre como herramienta diagnóstica con el fin de identificar la presencia de células tumorales de colon (335). Desde entonces, se han identificado

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

diversos biomarcadores de cáncer en suero, como el *carcinoma antigen 125* (CA-125) en el cáncer de ovario (336) o el antígeno prostático específico (PSA) para el CaP (296). Sin embargo, la baja sensibilidad de dichos biomarcadores como herramienta de diagnóstico ha impulsado a buscar nuevos biomarcadores no invasivos en biopsia líquida para el diagnóstico, tales como las células tumorales circulantes, microvesículas, y los exosomas y su cargo, como son los miRNAs (233,296). En el contexto de los exomiRNAs, varios estudios sobre la distribución de ARN entre las células y las VEs secretados han dado lugar a preguntas sobre la representación de los exo-miRNAs del estado fisiológico y patológico de las células secretoras (337). Estudios posteriores demostraron una evidente distribución cuantitativa asimétrica de los ARN entre las células de origen y sus VEs (338) .

El estudio de los exo-miRNAs como herramienta de diagnóstico y pronóstico en el contexto del cáncer ha sido posible ya que la secreción de VEs del tejido cancerígeno es mayor que el tejido normal correspondiente (339). Además, los exo-miRNAs son representativos del tumor, a pesar de no saber realmente la precisión de dicha representación (231). Y por último, los exo-miRNAs están altamente protegidos de la degradación, incluso en condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo) y/o en presencia de ARNasas (340,341).

Todo ello ha permitido estudiar el papel de los exo-miRNAs como posibles biomarcadores en diferentes tumores tanto para su diagnóstico como su pronóstico, así como para la respuesta a los tratamientos (219). En la Tabla 17, se muestra una selección de estudios en humanos cuyo objetivo es estudiar los exo-miRNAs como posibles biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en diversos tipos de cáncer.

Tipo de Cáncer	Tipo de biofluido/Cohortes de estudio	Comportamiento de los exo-miRNAs	Utilidad clínica	Referencia
Ovario	Suero/50 pacientes con cáncer maligno y 10 pacientes con cáncer benigno	↑ exo-miR-21, -14, la familia de -200, -203, -205, -214	Pronóstico	(342)
	Suero/58 pacientes de cáncer de ovario epitelial clasificados según el estadio.	↓ exo-miR-34a en pacientes con cáncer avanzado	Pronóstico	(343)
Colon	Suero/34 pacientes con cáncer metastásico y 108 pacientes con cáncer no metastásico	↓ Niveles exo-miR-320d en pacientes metastásicos	Pronóstico	(344)
	Plasma/114 pacientes (40 con cáncer colorrectal, 22 con adenoma colorrectal y 52 pacientes controles)	↓ Niveles exo-miR-92b en pacientes con cáncer comparado con controles	Diagnóstico	(345)
Mama	Plasma/16 pacientes y 16 controles	↑ Niveles de Exo-miR-21 y -1246 en plasma de pacientes con cáncer de mama	Diagnóstico	(346)
	Orina/69 pacientes y 40 controles	↑ exo-miR-424 y ↓ exo-miR-423, -660 y -let7-i.	Diagnóstico	(347)
Pulmón	Plasma/80 pacientes con cáncer pulmonar y muestras de 30 pacientes normales	↑ exo-miR-320a y -622	Diagnóstico	(348)

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

	Suero/(Grupo Test: 26 pacientes y 12 controles Grupo de validación: 20 pacientes y 30 controles; y grupo sintomático: 47 pacientes con tumores y 13 controles)	↑ exo-miR-let-7b, -24 y -486 ↓ exo-miR-let-7e en pacientes con cáncer. ↑ Exo-miR-181b y -361b en pacientes con adenocarcinoma y controles.	Diagnóstico	(349)
Gástrico	Suero/36 pacientes y 12 controles sanos	↓ exo-miR-92b-3p, -146b-5p, -9-5p y -7g-5p en pacientes con cáncer gástrico.	Diagnóstico	(350)
Nasofaríngeo	Suero/65 pacientes y 20 controles	↑ exo-miR-24-3p en pacientes con cáncer.	Diagnóstico	(318)
Renal	Sangre/82 pacientes y 80 controles	↑ exo-miR-1233 en pacientes con cáncer renal	Diagnóstico	(351)
Páncreas	Orina/9 pacientes y 7 controles	El cociente exo-miR-3940-5p/exo-miR-8069 ↑ en VEs de orina de pacientes con cáncer de páncreas	Diagnóstico	(352)
	Suero/216 pacientes y 220 controles sanos	↑ exo-miR-122-5p y -193b-3p ↓ exo-miR-125b-5p, -192-5p, -221-3p y -27b-3p	Diagnóstico	(353)

Tabla 17 – Exo-miRNAs con utilidad pronóstica y/o diagnóstica en diferentes tipos tumorales

3.6 Exo-miRNAs en CaP

La primera evidencia de la producción de VEs por parte de la próstata fue reportada a finales de la década de 70 como “*partículas extracelulares rodeadas de membranas de tamaño nanométrico que se encuentran en el plasma seminal*”, las cuales llamaron prostasomas (354). Posteriormente se demostró que las células prostáticas secretan una elevada cantidad de VEs (355). Además, no solo las células cancerosas son capaces de secretar VEs, sino también todas las células que constituyen el microambiente tumoral prostático (fibroblastos, macrófagos, adipocitos, células endoteliales, etc) para facilitar la comunicación intercelular necesaria para el establecimiento y progresión tumoral (237).

El diagnóstico del CaP está basado en parámetros clínicos y marcadores comentados en el apartado 1.2.2 *Diagnóstico del CaP*. La heterogeneidad clonal del tumor y la imposibilidad de rastrear todo el órgano ha llevado a la búsqueda de nuevos biomarcadores no invasivos en biopsia líquida que permitan la rápida detección para poder discernir entre el tumor indolente del agresivo.

El uso diagnóstico y pronóstico de los exosomas (clase de VEs más estudiado en el contexto del cáncer) y de su cargo es objeto de estudio en CaP mediante su aislamiento de medio de líneas celulares, plasma, suero, orina o semen. Estudios realizados aislando exo-miRNAs partir de líneas celulares de próstata *in vitro*, han demostrado que contribuyen a la progresión tumoral inhibiendo la apoptosis, aumentando la proliferación y fomentando la migración (356,357). En la Tabla 18 se listan exo-miRNAs relacionados con procesos proliferativos, invasivos y metastásicos, de modulación del sistema inmune y de respuesta a tratamiento en el contexto de CaP.

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

exo-miRNAs	Líneas celular o biofluido de aislamiento y estudio	Efecto celular observado	Referencia
Exo-miR-1246	Aislado en Plasma y corroborado en PC-3	Controla la transición epitelial a mesenquimal mediante la inhibición de CDH2, VIM and ZEB1	(358)
Exo-miR-34a	Aislado en Orina y corroborado en 22Rv1 y PC-3	Regula la expresión de BCL-2 y, puede ser responsable de la respuesta al docetaxel	(359)
Exo-miRNA-27a	Aislado en PSC-27 y corroborado en PSC-27 y PC-3	Controla la expresión de p53 para favoreciendo la quimiorresistencia del CaP.	(360)
Exo-miR-375	Aislado en LNCaP y corroborado en Osteoblastos	Incrementa la actividad de los osteoblastos	(361)
Exo-miR-3176, -141-3p, -5004-5p, -16-5p, -3915, -488-3p, -23c, -3673 y -3654	Aislado y corroborado en DU-145 y PC-3	Regula la expresión del receptor de andrógenos y de PTEN	(362)
exo-miR-32-5p, -141-3p, -606, -381 y -429	Aislado y corroborado en DU-145 y PC-3	Regula la expresión de TCF4	
Exo-miR-125a	Aislado en DU-145 y corroborado en RaW264.7	Regula AKT1 suprimiendo la proliferación	(363)

Abreviaciones: **CDH2:** N-Cadherina; **VIM:** Vimentina; **ZEB1:** *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*; **BCL-2:** *B-cell lymphoma 2*; **p53:** proteína 53; **PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; **TCF4:** Factor de Transcripción 4; **AKT1:** RAC-alfa serina / treonina-proteína quinasa

Tabla 18 – Exo-miRNAs relacionados con procesos proliferativos, invasivos y, metastásicos, de modulación del sistema immune y de respuesta a tratamiento en aislados a partir líneas celulares de CaP o de biofluidos humanos.

La Tabla 19 recoge el papel de los exo-miRNAs como herramienta en el diagnóstico, pronóstico y su comportamiento a la respuesta a tratamientos en el contexto del CaP.

Utilidad clínica	Biofluido/línea celular	Exo-miRNA	Comportamiento de los exo-miRNAs	Referencia
Pronóstica	Suero	Exo-miR-141 y -375	↑ Asociados con CaP metastásico posterior a la prostatectomía radical	(364)
	Plasma	Exo-miR-1290 y -375	↑ exo-miRNA-1290 y -375 en pacientes con CaP con recidiva	(365)
	Plasma	Exo-let-7a-5p	↓ en pacientes con CaP agresivo comparado con CaP indolente	(366)
	Suero	Exo-miR-1246	↑ exo-miRNA-1246 y postulado como biomarcador predictivo de CaP	(358)
	Suero	Exo-miR-141	↑ exo-miRNA-141. Discrimina pacientes con metástasis de los pacientes con cáncer localizado	(367)
	Orina	Exo-miR-145	↑ en pacientes con CaP.	(368)
	Semen	Exo-miR-342-3p y -374b-5p	↑ exo-miRNA-342-3p y ↓ -374b-5p en pacientes con CaP agresivo	(369)
Diagnóstica	Orina	Exo-miR-19b	↑ en pacientes con CaP	(370)
	Orina	Exo-miR-2909	↑ exo-miRNA-2909 en pacientes con CaP respecto de pacientes control	(371)
	Orina	Exo-miR-196a-5p y -501-3p	↓ en pacientes con CaP	(372)
	Orina	Exo-miR-574 y -141	↑ en pacientes con CaP	(373)
	Plasma	Exo-miR-200c-3p y -21-5p	↑ en pacientes con CaP comparando con pacientes con hiperplasia benigna	(366)
	Semen	Exo-miR-142-3p y -142-5p	↑ exo-miRNA-142-3p y -142-5p en pacientes con CaP.	(369)
	Sedimentos en orina	Exo-miR-21 y -375	↑ exo-miRNA-21 -375 en pacientes con cáncer comparado con controles.	(374)

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-miRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Respuesta a Tratamientos	22Rv1, DU145, y PC3	Exo-miR-34a	↓ <i>exo-miRNA-34a</i> . Proponen como marcador de predicción de la respuesta al docetaxel para la progresión del CaP	(359)	
	Línea celular PSC-27	Exo-miR-27a	↑. Propuesto como biomarcador de predicción de la respuesta al tratamiento.	(360)	
	DU-145 y PC-3	Exo-miR-3176, -141-3p, -5004-5p, -16-5p, -3915, -488-3p, -23c, -3673 y -3654		↑ Relacionados con la respuesta a los tratamientos	(362)
		Exo-miR-32-5p, -141-3p -606, -381 y -429		↓ Relacionados con la respuesta a los tratamientos. Su diana es TCF4	

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; **TCF4:** Factor de transcripción 4; **p53:** proteína 53

Tabla 19 - *Exo-miRNAs* estudiados como posibles biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y resistencia a tratamientos en el contexto del CaP (biofluidos y líneas celulares).

3.7 Abordaje terapéutico y perspectiva en el futuro de los *exo-miRNAs* en cáncer

Los *miNAS* son ideales para uso terapéutico debido a su pequeño tamaño, su papel clave en la comunicación celular, y los mecanismos de internalización celular (375). VEs derivados de *stem cells* mesenquimales, pluripotentes, embrionarias o células progenitoras cardíacas se han investigado cómo terapia aplicada a diferentes patologías respiratorias, cardiovasculares, musculares, gastrointestinales, renales y tumorales (376).

El objetivo terapéutico del uso de VEs en el ámbito del cáncer se ha dirigido a disminuir la invasión, migración, proliferación celular, mejorar la respuesta inmune, inducir muerte celular y aumentar la sensibilidad a la quimioterapia (326,377,378). Además, se han elaborado nuevas estrategias destinadas a inhibir la liberación de VEs o su absorción, como el silenciamiento de la proteína rab 27, tratamiento con GW4869, que bloquea la biogénesis de VEs (296,379).

La caracterización de *exo-miRNAs* involucrados en procesos oncogénicos ha permitido formular nuevas terapias anticancerígenas basadas en inhibir la actividad de dichos *miRNAs* o el uso de mimics codificados en vectores para aumentar la actividad de *miRNAs* (380,381). Schmittgen *et al.* demostraron el potencial terapéutico de los *exo-miRNAs* en el restablecimiento del funcionamiento del sistema inmune en neuroblastoma utilizando partículas liberadas por células Natural Killers, para administrar y restaurar los niveles de *miR-186* y reducir el tamaño del tumor (379).

A pesar del auge de los *exo-miRNAs* como herramientas de diagnóstico y pronóstico, el uso terapéutico de los *exo-miRNAs* aún se encuentra en una etapa embrionaria. Además, no podemos determinar hasta la fecha si realmente el abordaje terapéutico se realiza mediante *exo-miRNAs* o *miRNAs* libres, ya que se necesita mejorar la eficiencia de la producción y aislamiento de VEs, la optimización de procesos ligados a la pureza y lograr una dosis-respuesta efectiva (376). En la

Introducción – Vesículas Extracelulares y exo-miRNAs

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Tabla 20 se detallan diferentes métodos terapéuticos utilizados para la administración de microRNAs con finalidad terapéutica.

Método de entrega	Características	Ventajas
Oligonucleótidos anti-miRNA	Secuencia complementaria a miRNAs maduros	Bloqueo de miRNAs <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
2'-Ome	Modificación 2'-O-metilo	Estable y resistente a las nucleasas
2'-MOE	Modificación 2'-O-metoxietilo	Estable, eficiente y específico
LNA	Modificación de 2'-4'-metileno	Más resistente a las nucleasas endógenas, tiene una mayor afinidad con la diana y menor toxicidad.
AAV	Vectores asociados a adenovirus	Ampliamente utilizado como método
Espanjas	Uso de plásmidos que poseen múltiples sitios de unión en tándem para miRNAs dirigidos	Bloquea miRNAs relacionados (familia)
Plásmidos	Plásmido que tiene gen miRNA encapsulado en liposoma	Utilizado para la entrega de miRNA.
Mediada por Polietilimina	Partícula a nanoescala	Administrar miRNA de forma sistémica o local
CC9	Nanopartículas dirigidas al tumor	Utilizado en procesos tumorales
Péptido anti-miR	Péptido artificial como cadena principal con similitud con el miRNA	Se une a los miRNAs relativamente más estable y puede administrarse con toxicidad baja

Tabla 20 – Diferentes vehículos de entrega de microRNAs para uso terapéutico

Con el objetivo de ofrecer nuevos tratamientos dirigidos y fácilmente monitorizados, se están investigando diferentes sistemas de suministro de dichos miRNAs como estrategias virales, no virales o basadas en nanopartículas (375). En la Tabla 21 se presentan terapias actuales, en diferentes fases de estudio, en las que se están utilizando los miRNAs como posible herramienta terapéutica en el contexto del cáncer.

Nombre de la compañía	Agente Terapéutico	Enfermedad	Estatus del estudio	Detalles del ensayo	Identificador ClinicalTrials.gov
Mirna Therapeutics, Inc	MRX34 (Mimic de miR-34)	Carcinoma de pulmón, linfoma de cáncer de hígado primario, melanoma, mieloma múltiple, carcinoma de células renales	Fase multicéntrica I terminada	Reducción en la expresión de oncogenes, regresión tumoral, mejora la supervivencia	NCT01829971
ARD Foundation y EnGeneIC Limited	MesomiR-1 (mimic del miR-16)	Mesotelioma pleural maligno, cáncer de pulmón no microcítico	Fase multicéntrica I terminada	Inhibición del crecimiento tumoral	NCT02369198
miRagen Therapeutics	MRG-106 (AntimiR de miR-155)	Linfoma cutáneo de células T, micosis fungoide, leucemia linfocítica crónica y de células T	Fase II	Reduce la sobreexpresión de miRNAs, disminución de la proliferación	NCT02580552
Regulus Therapeutics	AntimiR de miR-10b	Astrocitoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, astrocitoma anaplásico, glioblastoma	Preclínica	Reduce la proliferación e induciendo apoptosis	NCT01849952
Regulus Therapeutics	AntimiR de miR-221	Cáncer Hepatocelular	Preclínica	Reducción de la progresión tumoral y aumento de la supervivencia	NCT02928627

Tabla 21 - miRNAs terapéuticos en fase clínica en el área del cáncer. Fuente: Tessitore et al.(375)

Introducción – Vesículas Extracelulares y *exo-miRNAs*

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

En el contexto del CaP, actualmente no se ha descrito aún ningún estudio en curso para el posible uso de miRNAs como dianas terapéuticas.

Cabe mencionar que hay diversos inconvenientes en la traslacionalidad de las aplicaciones de los miRNAs a la práctica clínica. La mayoría de los modelos *in vivo* se caracterizan por ser inmunosupresores, por lo que la respuesta real a la administración de miRNAs también debe evaluarse analizando los efectos a las posibles respuestas del sistema inmune. La mayoría de los estudios se realizan para observar la respuesta a corto plazo, y los posibles efectos a largo plazo deben analizarse más a fondo. Además, cabe recalcar que se debe asegurar que la administración de miRNAs sea lo más homogéneo posible en la masa tumoral, puesto que es uno de los mayores hándicaps

Así pues, el conocimiento de las propiedades farmacocinéticas de los miRNAs, la optimización de la estabilidad, la mejora en los sistemas de administración y la comprensión y el control de los posibles efectos secundarios son todavía escollos a vencer para la futura la aplicación de estas moléculas a la terapia del cáncer en humanos.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que:

- La inflamación crónica se ha asociado con el desarrollo y la progresión del cáncer.
- Los niveles séricos de la citoquina inflamatoria sTWEAK se han relacionado con patologías metabólicas asociadas a estados inflamación de bajo grado e incluso con ciertos tipos de cáncer, como el de cabeza y cuello, y se ha demostrado que pueden ser útiles cómo biomarcadores de pronóstico y/o diagnóstico en dichos contextos.
- La citocina sTWEAK se ha detectado en biofluidos de pacientes con CaP.
- Citocinas inflamatorias tales como IL-6, IL-1 o IL-8 pueden provocar cambios en el metabolismo tumoral (Homeostasis de la glucosa, aumento de la lipólisis, etc.).
- Las citocinas pueden provocar la secreción de VEs y su cargo, los exomiRNAs, pueden tener un efecto regulador sobre procesos involucrados en la patogénesis tumoral, además de ser útiles como herramienta no invasiva de diagnóstico, pronóstico y monitorización de patologías.

Postulamos que:

La citocina TWEAK podría estar relacionada con el metabolismo del CaP y, su presencia en este microambiente podría inducir la liberación de exomiRNAs, y su detección en biofluidos ser útil como biomarcadores de pronóstico

Nuestro objetivo principal es:

Estudiar el papel de la citocina TWEAK en el microambiente del CaP, con relación al contexto metabólico y así como su efecto sobre la liberación de VEs y su cargo (exomiRNAs)

Hipótesis y Objetivos

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Estudio 1

Objetivo Principal: Estudiar la citocina sTWEAK en relación con el contexto metabólico del paciente con CaP y determinar su efecto metabólico *in vitro*.

Objetivos Secundarios:

- a) Estudiar la relación de los niveles séricos de sTWEAK con el estatus metabólico de los pacientes con CaP y la presencia de cáncer.
- b) Valorar el efecto de sTWEAK *in vitro* sobre la expresión de genes asociados con el metabolismo lipídico y glucídico, y determinar las vías de señalización asociadas en líneas celulares de CaP.

Estudio 2

Objetivo Principal: Identificar y caracterizar funcionalmente exomiRNAs regulados por la presencia de sTWEAK en el microambiente del CaP como estrategia para hallar nuevos biomarcadores de pronóstico y nuevas dianas terapéuticas.

Objetivos Secundarios:

- a) Aislar y cuantificar exomiRNAs en líneas celulares de CaP estimuladas con sTWEAK.
- b) Validar los exomiRNAs, seleccionados del estudio *in vitro*, en biopsia líquida (semen y orina) en una cohorte de pacientes con CaP estratificados en Bajo Riesgo y Alto Riesgo según ISUP.
- c) Valorar la utilidad de los exomiRNAs, en combinación con los niveles de sTWEAK y PSA, cómo panel de pronóstico del CaP.
- d) Identificar posibles dianas con potencial interés terapéutico de los exomiRNAs validados

Resultados

RESULTADOS

Estudio 1

Serum Levels of the Cytokine TWEAK Are Associated with Metabolic Status in Patients with Prostate Cancer and Modulate Cancer Cell Lipid Metabolism in Vitro

Altuna-Coy, A.; Ruiz-Plazas, X.; Alves-Santiago, M.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R.

Cancers 2021, 13, 4688.

Doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13184688>

Estudio 2

Liquid Biopsy-Based Exo-oncomiRNAs Can Predict Prostate Cancer Aggressiveness

Ruiz-Plazas, X.; Altuna-Coy, A.; Alves-Santiago, M.; Vila-Barja, J.; García-Fontgivell, J.F.; Martínez-González, S.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R.

Cancers 2021, 13, 250

Doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13020250>

Article

Serum Levels of the Cytokine TWEAK Are Associated with Metabolic Status in Patients with Prostate Cancer and Modulate Cancer Cell Lipid Metabolism In Vitro

Antonio Altuna-Coy ^{1,†}, Xavier Ruiz-Plazas ^{1,2,†}, Marta Alves-Santiago ^{1,2}, José Segarra-Tomás ^{1,2,*},
and Matilde R. Chacón ^{1,*,‡}

¹ Disease Biomarkers and Molecular Mechanisms Group, IISPV, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain; antonio.altuna@iispv.cat (A.A.-C.); xruiz.hj23.ics@gencat.cat (X.R.-P.); malves.hj23.ics@gencat.cat (M.A.-S.)

² Urology Unit, Joan XXIII University Hospital, 43005 Tarragona, Spain

* Correspondence: jsegarra.hj23.ics@gencat.cat (J.S.-T.); matilde.rodriguez@urv.cat (M.R.C.);
Tel.: +34-977295500 (ext. 3406) (J.S.-T. & M.R.C.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors are joint senior authors on this work.

Simple Summary: TWEAK is an inflammatory cytokine related to prostate cancer (PCa) progression that exerts its effects by engaging its cognate receptor Fn14. A soluble form of TWEAK (sTWEAK) has been detected in the PCa microenvironment. Altered levels of circulating sTWEAK are associated with aberrant glucose metabolism. We show that reduced serum levels of sTWEAK are associated with the metabolic status in patients with PCa and that the treatment of PC-3 cells with sTWEAK enhances the expression of genes related to lipid, but not to glucose, metabolism. sTWEAK also increases the lipid uptake and lipid accumulation in PC-3 cells. We corroborated that the observed effects were due to TWEAK/Fn14 engagement by silencing Fn14 expression, which attenuated the aberrant gene and protein expression. Additionally, we observed that the phosphorylation of ERK1/2 and AKT (ser473) were required for TWEAK/Fn14 actions. Thus, the contribution of the sTWEAK/Fn14 axis on PCa metabolism supports its potential as a therapeutic target for PCa.

Abstract: Soluble TWEAK (sTWEAK) has been proposed as a prognostic biomarker of prostate cancer (PCa). We found that reduced serum levels of sTWEAK, together with higher levels of prostate-specific antigen and a higher HOMA-IR index, are independent predictors of PCa. We also showed that sTWEAK stimulus failed to alter the expression of glucose transporter genes (*SLC2A4* and *SLC2A1*), but significantly reduced the expression of glucose metabolism-related genes (*PFK*, *HK1* and *PDK4*) in PCa cells. The sTWEAK stimulation of PC-3 cells significantly increased the expression of the genes related to lipogenesis (*ACACA* and *FASN*), lipolysis (*CPT1A* and *PNPLA2*), lipid transport (*FABP4* and *CD36*) and lipid regulation (*SREBP-1* and *PPARG*) and increased the lipid uptake. Silencing the TWEAK receptor (Fn14) in PC-3 cells confirmed the observed lipid metabolic effects, as shown by the downregulation of *ACACA*, *FASN*, *CPT1A*, *PNPLA2*, *FABP4*, *CD36*, *SREBP-1* and *PPARG* expression, which was paralleled by a reduction of *FASN*, *CPT1A* and *FABP4* protein expression. Specific-signaling inhibitor assays show that ERK1/2 and AKT (ser473) phosphorylation can regulate lipid metabolism-related genes in PCa cells, pointing to the AKT locus as a possible target for PCa. Overall, our data support sTWEAK/Fn14 axis as a potential therapeutic target for PCa.

Keywords: TWEAK; prostate cancer; lipid metabolism; Fn14



Citation: Altuna-Coy, A.; Ruiz-Plazas, X.; Alves-Santiago, M.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R. Serum Levels of the Cytokine TWEAK Are Associated with Metabolic Status in Patients with Prostate Cancer and Modulate Cancer Cell Lipid Metabolism In Vitro. *Cancers* **2021**, *13*, 4688. <https://doi.org/10.3390/cancers13184688>

Academic Editor: Frédéric Bost

Received: 20 August 2021

Accepted: 14 September 2021

Published: 18 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the second-most commonly diagnosed cancer in men worldwide [1]. A central challenge in the management of PCa is discriminating between the

indolent and aggressive disease, and the early detection of PCa is important to guide treatment strategies. In this context, the prostate-specific antigen (PSA) test, as well as the tumor, node, metastasis (TNM) classification and the Gleason score in prostate biopsies, are routinely used for predicting the prognosis and informing treatment decisions [2]. The current treatments for PCa include radical prostatectomy, performed as a curative therapy, and androgen deprivation treatment, which is typically achieved using androgen receptor antagonists.

Solid tumors employ aerobic glycolysis to generate energy (the so-called Warburg effect). To support transformation, cancer cells can rewire their metabolism to sustain the production of energy, and, in this sense, fatty acid metabolism has recently received particular attention. Cancer cells can fuel their fatty acid metabolism through the activation of pathways such as the PI3K-AKT-mTORC1 signaling axis [3]. Fatty acids can be obtained from de novo lipogenesis and from exogenous uptake, which are facilitated by transporters such as CD36 (cluster of differentiation 36) and FABP (fatty acid-binding protein). Fatty acids can be stored as lipid droplets and used for acetyl-CoA production through β -oxidation. De novo lipogenesis relies on the enzymatic activities of ACLY (ATP citrate synthase), ACACA (acetyl-CoA carboxylase alpha) and FASN (fatty acid synthase), which generate diverse lipid species [3,4].

Aberrancies in cellular metabolism in PCa are recognized hallmarks of malignant transformation [5]. Indeed, the large amount of citrate that would normally be secreted functions as an intermediate in the citric acid cycle and as a substrate for de novo fatty acid synthesis. In this regard, the dysregulation of lipid metabolism involving the upregulation of lipogenic enzymes and of enzymes that function to oxidize fatty acids as an energy source is a common finding in PCa [6]. Furthermore, a recent systematic review and meta-analysis found that patients with PCa had higher fasting serum insulin and higher homeostasis model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) levels, especially those over 65 years of age [7]. Insulin is a known growth factor for PCa cells [8]; however, its role in PCa etiology remains unclear.

A strong association is known to exist between chronic inflammation and several types of cancer, and inflammatory cytokines have been considered as potential mediators of prostate carcinogenesis [9]. Yet, the modulatory actions of the inflammatory factors on energy metabolism in prostate epithelial cells have been poorly investigated.

The tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a cytokine expressed mainly by monocytes and macrophages [10]. TWEAK can exist as a full-length, membrane-anchored form (mTWEAK) on the cell surface [10] or as a biologically active soluble form (sTWEAK) generated by the proteolytic processing of mTWEAK, which is detectable in the extracellular milieu and biofluids [11]. Both forms functionally engage the fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) receptor to activate downstream signaling pathways [12,13]. Early studies on the TWEAK/Fn14 axis in PCa identified Fn14 as a candidate for enhanced PCa growth in xenografted mice under high-fat feeding [14] and with a probable role in invasion, migration and proliferation in PCa cell models [15]. Similarly, the overexpression of Fn14 contributes to multiple malignant cellular phenotypes associated with cancer progression in androgen-independent PCa cell lines, in part controlled by the tissue remodeling enzyme matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) [15]. The finding of a potential relationship between the Fn14 expression and patient outcome in patients undergoing radical prostatectomy for localized PCa [15] points to Fn14 as a novel prognostic biomarker candidate in PCa. In an effort to identify new PCa biomarkers in liquid biopsies, we recently established that semen levels of sTWEAK were lower in high-risk patients than in low-risk peers and that this reduction was accompanied by a trend for an increase in the Fn14 mRNA expression levels in seminal cell sediment [16]. More recently, we found that sTWEAK semen levels and TWEAK-induced oncogenic shuttle microRNAs could be integrated into an improved PCa prognostic panel based only on information obtained from semen [17].

sTWEAK serum levels are significantly and independently associated with an increased risk of type 2 diabetes and metabolic syndrome [18], collectively highlighting a possible role for sTWEAK in the pathogenesis of metabolic diseases. This is supported by the finding that sTWEAK can modulate in vitro human hepatocyte lipid accumulation [19].

Given the established relationship between sTWEAK and metabolic-related pathologies, we sought to study whether there was a possible link between circulating sTWEAK levels and the metabolic status of patients with PCa. To this end, we investigated sTWEAK serum levels in a well-characterized cohort of patients with PCa in relation to glucose and lipid metabolic profiles. Additionally, to better understand the impact of inflammation on metabolic dysregulation in PCa, we used cell models to investigate whether this cytokine, previously reported to be present in the prostate microenvironment, could alter local glucose and/or lipid metabolism in PCa.

2. Materials and Methods

1. Study Population

This was a cross-sectional, case-control, retrospective study of 76 patients with PCa and 159 controls. Control patients with PSA levels below average for their age (<1.3 ng/mL PSA with ages 60–69 years; <1.7 ng/mL PSA with ages 70–79 years) [20] were recruited from outpatients in the hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain. Patients with PCa, recruited from the same hospital, had undergone radical prostatectomy, which was supported by the European guidelines and was a treatment option in our Urology Department. The surgeries were performed between 2015 and 2020. The grades, groups and stages of the tumors were determined according to the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Gleason Grading (GG) and TNM classification. The patients were stratified into two groups, according to the ISUP GG: low-risk (ISUP Groups I and II) and high-risk (ISUP Groups III, IV and V). This study was performed according to the provisions of the Declaration of Helsinki and was approved by our local ethics committee and adhered to the current legal regulations (Biomedical Research Law 14/2007, Royal Decree of Biobanks 1716/2011 and Organic Law 15/1999 of September 13 Protection of Personal Data). All methods were approved and performed in accordance with the guidelines and regulations of the Ethical Committee for Clinical Research (CEIM) from the Pere Virgili Research Institute (Ref. CEIM171/2017; CEIM205/2020 approved on 02/10/2017 and 24/09/2020, respectively).

2. Biochemical Data

All patients underwent anthropometric measurements. Blood was extracted for measurements of plasma lipids, glucose, insulin and sTWEAK after an 8-h fast. The glucose and lipid levels were determined by standard laboratory methods. Serum insulin was measured in duplicate using a monoclonal immunoradiometric assay (Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). The serum γ -glutamyltransferase (GGT), uric acid and creatinine levels were determined using enzymatic methods. The HOMA-IR index was calculated using the following formula:

$$\text{serum glucose (mmol/L)} \times \text{serum insulin (mU/L)} / 22.5. \quad (1)$$

Serum concentrations of sTWEAK were determined in duplicate by the enzyme-linked immunosorbent assay using the human TWEAK/TNFSF12 Kit #DY1090 (R&D Systems Europe, Abingdon, Oxon, UK). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.5% and 7.0%, respectively, and the sensitivity of the test was 62 pg/mL.

3. Cell Culture and Treatments

The prostate cancer cell lines PC-3 (androgen-insensitive) and LNCaP (androgen-sensitive) and the histologically normal prostate epithelial RWPE-1 cell line (immortalized with papilloma virus 18) were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). PC-3 cells were cultured in Ham's F-12K (Kaighn's) Medium (1:1 mixture) with L-glutamate (Invitrogen/Gibco, Fisher Scientific SL, Madrid, Spain). LNCaP cells were cultured in RPMI

1640 medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) supplemented with 1-mM sodium pyruvate (Gibco). PC-3 and LNCaP cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum. RWPE-1 cells were cultured in keratinocyte serum-free medium plus 5 µg/mL bovine pituitary extract. All the cells were supplemented with 1× antibiotic-antimycotic (Gibco) and 5 µg/mL Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA, USA). Where indicated, the cells were grown in serum-deprived medium overnight before stimulation for 24 or 48 h with 100 ng/mL human recombinant TWEAK (PeproTech, bioNova científica, Barcelona, Spain) and were cultured in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

4. siRNA Experiments

An siRNA targeting the human Fn14 gene (*TNFRSF12A* siRNA sequence sense 5'-GAGGGAGAAUUUAAUAAUATT-3' and antisense 5'-UAUUAAUAAAUUCUCCCUC-3') and an siRNA control (MOCK) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, Madrid, Spain). The transfected siRNAs concentration used was 50 nM, as recommended by the manufacturer, and has been tested elsewhere [21]. Opti-MEM and Lipofectamine 3000 were used for the transfection (Thermo Fisher Scientific). Twenty-four hours after the transfection, the cells were stimulated or not with 100 ng/mL human recombinant TWEAK for 48 h and then collected for gene expression and protein analysis.

5. Inhibitor Treatments

The MEK inhibitor PD184352 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used at a final concentration of 10 µM, which led to successful p-ERK inhibition [22]. The AKT inhibitor MK2206 (Deltaclon S.L., Madrid, Spain) was used at a final concentration of 1 µM [23]. Parthenolide (Sigma-Aldrich) and Amgen16 (Sigma-Aldrich) were used for NF-κB canonical and noncanonical inhibition, respectively, at 10 µM [24,25]. PC-3 cells were treated with inhibitors for 1 h before stimulation with 100 ng/mL TWEAK (or vehicle) for 24 h. RNA was then extracted for gene expression analysis.

6. Determination of Fatty Acid Uptake and Lipid Accumulation

PC-3 cells were seeded in 96-well clear flat-bottom black plates, and treatments with sTWEAK and with siFn14 were performed as described above. To quantify the fatty acid uptake, the growth medium was exchanged with TF2-C12 fatty acid (Sigma-Aldrich), and the cells were incubated at 37 °C for 30 min. The cellular uptake was measured on a Varioskan Lux Reader (Thermo Fisher Scientific) by the measurement of fluorescence intensity ($\lambda_{ex} = 485/\lambda_{em} = 515$ nm). The lipid content was measured with Nile Red (Sigma-Aldrich). Briefly, the media were removed, cells were washed twice with PBS and lipids were stained with 1.1 mg/mL Nile Red for 15 min at 37 °C. After incubation, the cells were washed with PBS, followed by measurement of the fluorescence intensity ($\lambda_{ex} = 488/\lambda_{em} = 590$ nm).

7. Gene Expression Analysis

RNA was extracted, cDNA was synthesized, and real-time quantitative PCR was performed on a 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as described [26]. Gene quantification was performed using the following commercial Taqman assays (Applied Biosystems): *ACACA*, *ACLY*, *FASN*, *CPT1*, *PNPLA2*, *SREBP-1*, *PPARG*, *FABP4*, *CD36*, *SLC2A1*, *SLC2A4*, *HK1*, *PFKM*, *PDK4*, *PDHA1* and *PKM2*. The cycle threshold (CT) value for each sample was normalized to the expression of *PPIA* (peptidylprolyl isomerase A), used as an internal control. SDS software (2.3, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems) were used to analyze the results with the comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

8. Western Blot Analysis

A total of 25 µg of protein was fractionated on 4–15% gradient SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes using the standard protocols. The following

primary antibodies were used: p-ERK1/2 (#4370), p-p38 (#4511), p-JNK (#4668), p-IKB (#2859), NF-kB2 p100/p52 (#4882), Fn14 (#4403), p-AktS473 (#9271), FASN (#3180S) and CPT-1A (#12252) and were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), FABP4 (SC18661) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) and anti-β-actin was purchased from Sigma-Aldrich. The antibodies were used at the dilutions recommended by the manufacturers.

2.9. Statistical Analysis

For the clinical, anthropometrical and analytical parameters, all data were tested for normality using the Shapiro–Wilk test. Normally distributed data were reported as the mean and standard deviation (SD). Differences between patient groups were tested with the Mann–Whitney *U* test. Spearman’s correlation coefficients were used to analyze the relationship between normally and non-normally distributed parameters. Multiple logistic regression analyses were employed (stepwise backward selection procedures) to determine whether the sTWEAK levels were associated with the presence of PCa. In vitro experimental results were presented as the mean and standard error of the mean (SEM) of 3 to 4 independent experiments. The differences were tested with the unpaired two-tailed Student’s *t*-test. The statistical software SPSS 21.0 (IBM, Madrid, Spain) and R package (R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) were used for the analyses. Significance was considered at a *p*-value < 0.05.

3. Results

1. Low Concentrations of sTWEAK Are Associated with PCa

The baseline characteristics of the 76 patients with PCa and the 159 controls included in the present study are shown in Table 1. Fasting plasma glucose, serum insulin, HOMA-IR, HDL-cholesterol, creatinine and total serum PSA levels were all significantly higher in patients with PCa than in the controls (Table 1), whereas the opposite was seen for the serum sTWEAK levels (Figure 1A). Spearman’s correlation coefficients are described in Figure 1B. The most relevant associations were the negative associations between the sTWEAK and serum PSA ($r = -0.178, p = 0.006$), insulin ($r = -0.156, p = 0.017$) and HOMA-IR ($r = -0.164; p = 0.012$) and the positive associations with the total cholesterol ($r = 0.234; p < 0.001$) and LDL cholesterol ($r = 0.163, p = 0.012$). Additionally, the serum PSA levels were positively associated with fasting glucose ($r = 0.194, p = 0.003$), insulin ($r = 0.473, p < 0.001$), HOMA-IR ($r = 0.465, p < 0.001$) levels and HDL cholesterol ($r = 0.149, p = 0.022$) and negatively associated with serum creatinine ($r = -0.172, p = 0.008$).

Table 1. Anthropometric and analytical characteristics of the studied cohorts.

Number of Patients	Controls <i>n</i> = 159 Mean ± SD	PCa Patients <i>n</i> = 76 Mean ± SD	<i>p</i> -Value
Anthropometric Parameters			
Age (years)	63.54 ± 7.26	63.51 ± 6.66	0.953
BMI (kg/m ²)	28.60 ± 2.31	28.24 ± 3.97	0.067
ISUP G G (n/%)	-	-	-
Low Risk (I and II)	-	48 (63%)	-
High Risk (Group III, IV, V)	-	28 (37%)	-
Glycemic profile			

Table 1. Cont.

Number of Patients	Controls <i>n</i> = 159 Mean ± SD	PCa Patients <i>n</i> = 76 Mean ± SD	<i>p</i> -Value
Anthropometric Parameters			
Glucose (mmol/L)	5.20 ± 0.53	6.03 ± 1.35	<0.001
Insulin (pmol/L)	30.60 ± 19.93	94.53 ± 55.33	<0.001
HOMA-IR	1.04 ± 0.74	3.75 ± 2.63	<0.001
Diabetes (<i>n</i> /%)	0 (0%)	8 (10.6%)	<0.001
Lipid profile			
Cholesterol (mmol/L)	5.17 ± 0.99	4.96 ± 1.04	0.233
HDL cholesterol (mmol/L)	1.22 ± 0.28	1.47 ± 0.66	0.001
LDL cholesterol (mmol/L)	2.87 ± 0.71	3.07 ± 1.23	0.185
Triglycerides (mmol/L)	1.50 ± 0.90	1.49 ± 0.81	0.925
Hepatic profile			
GGT (μkat/L)	0.64 ± 0.67	0.70 ± 0.79	0.404
Renal profile			
Uric acid (μmol/L)	366.46 ± 78.47	413.27 ± 379.57	0.527
Creatinine (μmol/L)	76.74 ± 13.31	70.98 ± 14.21	<0.001
Total PSA (μg/L)	1.64 ± 2.14	10.06 ± 7.73	<0.001
sTWEAK	1583.13 ± 1348.60	1197.20 ± 579.57	<0.001

Abbreviations: PCa, Prostate Cancer; SD, Standard deviation; ISUP (GG): International Society of Urological Pathology Gleason Grading; BMI, Body mass index; cc, centiliters; HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; HDL, High-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein; GGT, Gamma Glutamyltransferase; PSA, Prostate-specific antigen; sTWEAK, soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis.

A multivariate ordered logistic regression analysis was used to evaluate the independent predictors associated with PCa in the whole population. The variables included in the final model were the insulin, creatinine, HDL cholesterol, glucose, HOMA-IR, sTWEAK and PSA levels. The results showed that HOMA-IR (odds ratio (OR) = 0.126, $p < 0.001$), PSA serum levels (OR = 0.539, $p < 0.001$), HDL cholesterol (OR = 0.040 $p < 0.001$) and lower sTWEAK serum levels (OR = 1.002 $p < 0.001$) were independently associated with the presence of PCa (Figure 1C).

3.2. sTWEAK Treatment of PCa Cell Lines Alters the Expression of Genes Related to Lipid Metabolism but Not to Glucose Metabolism

To assess whether sTWEAK influences PCa cell metabolism, we examined for possible changes elicited by sTWEAK on the expression of the selected genes associated with glucose metabolism in two PCa cell lines (LNCaP and PC-3 cells) and a control, epithelial cell line (RWPE-1). All cell types expressed the gene for Fn14, which was upregulated under sTWEAK stimulation (Figure S1). The cell cultures were treated with sTWEAK for 24 and 48 h. The results showed that the expression of *SLC2A1* and *SLC2A4* (glucose transporters 1 and 4) decreased significantly in RWPE-1 cells after treatment with sTWEAK (48 h) but not in PC-3 and LNCaP cells (Figure 2A). Gene activity in the “preparatory phase” (energy consuming) of glycolysis was lower in PC-3 and RWPE-1 cells after a 24- and 48-h sTWEAK treatment, as shown by a significant decrease in the expression of hexokinase 1 (*HK1*) and 6-phosphofructo-1-kinase (*PFKM*), whereas no significant changes were observed in LNCaP cells (Figure 2B).

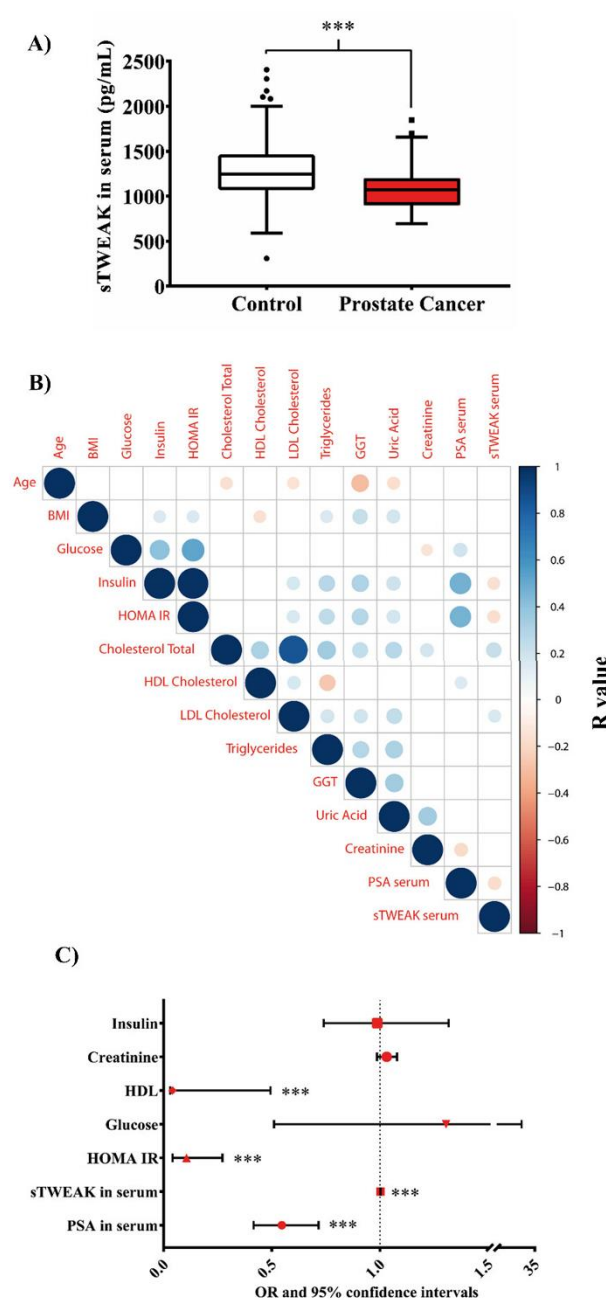


Figure 1. Circulating serum levels of sTWEAK in PCa. **(A)** Box plot (each box shows the median, quartiles and extreme values) representation of the sTWEAK serum levels in the control and PCa cohorts. *** $p < 0.001$. **(B)** Spearman's correlation matrix. Positive correlations are displayed in graded blue colors and negative correlations in graded red colors. Correlations with p -values ≥ 0.05 are considered as insignificant and are left blank. The color intensity and the size of the circle are proportional to the correlation coefficients. On the right side of the correlogram, the color legend shows the correlation coefficients and the corresponding colors. **(C)** Relationship between PCa and clinical, anthropometric and analytical parameters. Odds ratios (OR values in different red shapes for each parameter) and 95% confidence intervals. Dotted horizontal line: OR greater than 1 indicates that variable is more likely to occur in PCa and, an OR less than 1 indicates that variable is less likely to occur in PCa. *** $p < 0.001$. Abbreviations: BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; GGT, gamma glutamyltransferase; PSA, prostate-specific antigen; sTWEAK, soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis.

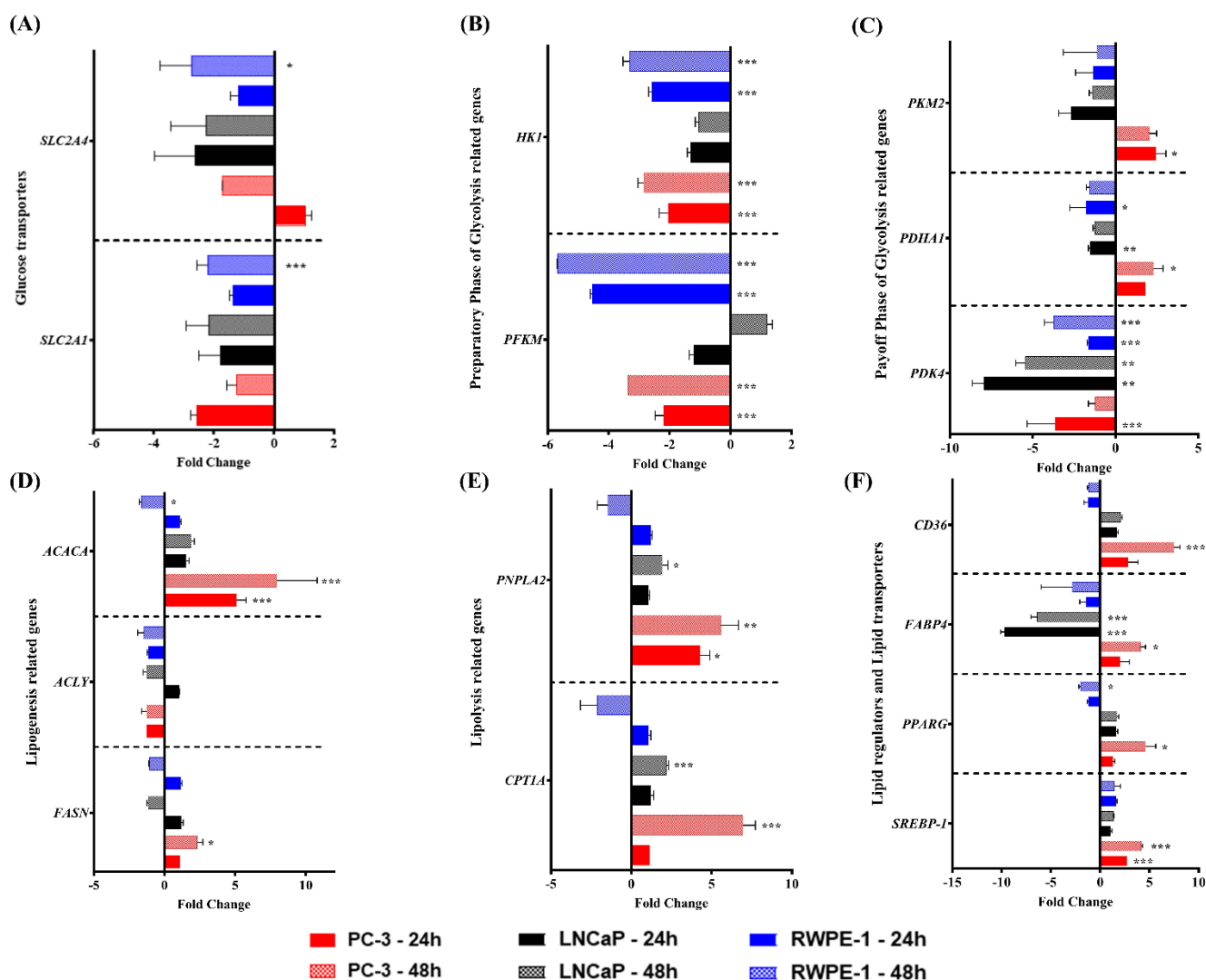


Figure 2. Effect of exogenous sTWEAK on the expression of the genes related to glucose and lipid metabolism. The glucose and lipid metabolism-related genes were evaluated by RT-qPCR after treating PC-3, LNCaP and RWPE-1 cells with 100 ng/mL TWEAK for 24 or 48 h. (A) Glucose transporters. (B) Preparatory phase of glycolysis. (C) Payoff phase of glycolysis. (D) Lipogenesis-related genes. (E) Lipolysis-related genes. (F) Lipid regulators and lipid transporter genes. Results are presented as the mean \pm SEM of 4 independent experiments of the fold change expression with respect to the nontreated respective controls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Abbreviations: *SLC2A1* and *SLC2A4*, glucose transporter 1 and 4, respectively; *HK1*, hexokinase 1; *PFKM*, 6-phosphofructo-1-kinase; *PKM2*, pyruvate kinase M2; *PDHA1*, pyruvate dehydrogenase alpha 1; *PDK4*, pyruvate dehydrogenase kinase 4; *ACACA*, acetyl-CoA carboxylase alpha; *ACLY*, ATP-citrate synthase; *FASN*, fatty acid synthase; *PNPLA2*, patatin-like phospholipase domain containing 2; *CPT1A*, carnitine palmitoyltransferase 1A; *CD36*, CD36 molecule; *FABP4*, fatty acid-binding protein 4; *PPARG*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *SREBP-1*, sterol regulatory element-binding transcription factor 1; PC-3, androgen-independent human advanced adenocarcinoma prostate cancer cell line, LNCaP, androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cell line; RWPE-1 epithelial cell line derived from the peripheral zone of a histologically normal adult human prostate.

We also examined the “payoff phase” (energy production) of glycolysis, which showed a differential response to sTWEAK in the PCa cell lines studied. Pyruvate kinase M2 (*PKM2*) gene expression was unchanged in LNCaP and control RWPE-1 cells, whereas pyruvate dehydrogenase alpha 1 (*PDHA1*) gene expression was significantly decreased at 24 h. By contrast, the gene expression of *PKM2* and *PDHA1* significantly increased at 24 and 48 h, respectively, in PC-3 cells. Additionally, the expression of pyruvate dehydrogenase kinase

4 (*PDK4*) was significantly lower in LNCaP cells at 24 h and in RWPE-1 cells at 24 and 48 h after TWEAK treatment (Figure 2C).

The downregulation of *PDK4* and concomitant upregulation of *PDHA1* in PC-3 cells is noteworthy, as *PDK4* is an inhibitor of *PDHA1*, which might indicate that the pyruvate generated by PKM2 is converted into acetyl-CoA by the action of *PDHA1*, thus entering the citric acid cycle and fueling lipogenesis in PC-3 cells.

Next, we investigated whether sTWEAK administration altered the expression of the genes involved in lipid metabolism in PCa cell lines. We found that sTWEAK treatment significantly increased the expression levels of lipogenesis-related genes such as acetyl-CoA carboxylase alpha (*ACACA*) at 24 and 48 h and fatty acid synthase (*FASN*) at 48 h of stimulation but only in PC-3 cells (Figure 2D). By contrast, the mRNA levels of *ACACA* were significantly lower under sTWEAK stimulation in the control RWPE-1 after 48 h. No changes were observed in the *ACACA* expression in LNCaP cells. Additionally, no changes were observed for the ATP citrate synthase gene expression (*ACLY*) in any cell model.

Examination of the lipolysis-related genes patatin-like phospholipase domain containing 2 (*PNPLA2*) and carnitine palmitoyltransferase 1A (*CPT1A*) revealed that both were significantly upregulated in PC-3 and LNCaP cells 48 h after sTWEAK administration, but no changes were observed in RWPE-1 cells (Figure 2E).

Other genes involved in lipid metabolism regulation, such as peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*) and sterol regulatory element binding transcription factor 1 (*SREBP-1*), were exclusively and significantly upregulated by sTWEAK treatment in PC-3 cells at 48 h, whereas *PPARG* was significantly downregulated in RWPE-1 cells (Figure 2F). Regarding lipid transporter-related genes, we observed a significant increase in a cluster of differentiation 36 gene expression (*CD36*) in sTWEAK-treated PC-3 at 48 h, whereas fatty acid-binding protein 4 (*FABP4*) expression was significantly downregulated in LNCaP cells at 24 and 48 h but was upregulated in PC-3 cells at 48 h (Figure 2F). No sTWEAK-induced changes in lipid transporter-related genes were observed in RWPE-1 cells.

A correlation between gene and protein expression under sTWEAK stimulation was verified by Western blotting for the selected lipid metabolism-related genes (Figure S2 and its detailed information can be found in supplementary materials).

3.3. Silencing of *Fn14* (*TNFRSF12A*) Abrogates the Ability of sTWEAK to Modulate Lipid Metabolism Genes in PC-3 Cells

Because lipid metabolism-related genes were significantly upregulated by sTWEAK in PC-3 cells, we chose this line for further analysis. To corroborate that the observed effects on the lipid metabolism were due to TWEAK/*Fn14* engagement, we silenced the *Fn14* gene (*TNFRSF12A*) using a specific siRNA. The cells were then stimulated with sTWEAK for 48 h. Compared with MOCK-transfected cells, the siRNA-mediated knockdown of the *Fn14* gene resulted in the complete reduction of its expression (mRNA and protein) (Figure 3A,B) after sTWEAK stimulation. Additionally, si*Fn14* treatment also abolished the significant sTWEAK-induced expression of genes involved in lipogenesis (*ACACA* and *FASN*), lipolysis (*PNPLA2* and *CPT1A*), lipid transport (*CD36* and *FABP4*) and lipid regulation (*PPARG* and *SREBP1*) (Figure 3A), clearly indicating that the observed effects of sTWEAK were due to ligand-receptor binding. These effects were paralleled by a reduction in the protein expression of the selected proteins *FASN*, *CPT1A* and *FABP4*, as evaluated by Western blotting (Figure 3B).

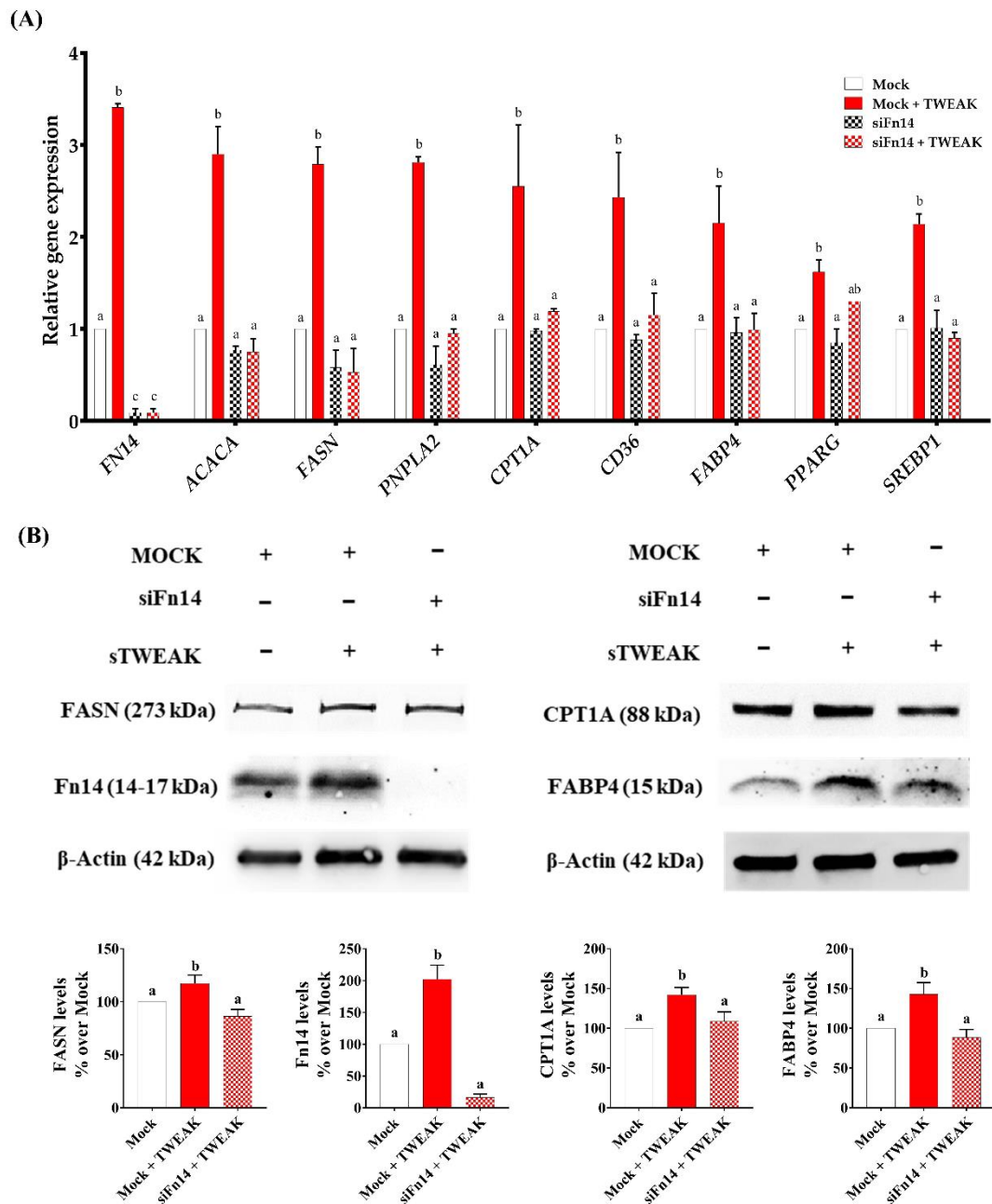


Figure 3. Inhibition of Fn14 in PC-3 cells blocks the sTWEAK-induced expression of lipid metabolism-related genes. (A) Fn14 was silenced in PC-3 cells using a Fn14 siRNA; a siRNA-negative sequence (MOCK) was used as a control. The cells were treated with 100 ng/mL TWEAK for 48 h, and the lipid-related gene expression was measured by RT-qPCR. (B) Protein expression in Fn14 siRNA/MOCK-transfected PC-3 cells of FASN, CPT1, Fn14 and FABP4 by Western blotting. Detailed information about the Western blotting can be found at Figure S3. Different lettering over the boxes indicates statistical differences. Significant differences are established at $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 3$ to 4 experiments). Abbreviations: Fn14, fibroblast growth factor-inducible 14; FASN, Fatty acid synthase; CPT1A, Carnitine palmitoyltransferase IA; siFn14, Fn14 small interfering RNA; FABP4, fatty acid-binding protein 4; ACACA, Acetyl-CoA Carboxylase Alpha; PNPLA2, patatin-like phospholipase 2; CD36, cluster of differentiation 36; PPAR γ , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; SREBP1, Sterol regulatory element-binding transcription factor 1; RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR.

3.4. sTWEAK Stimulates Fatty Acid Uptake and Lipid Accumulation in PC-3 Cells

To directly measure the stimulatory effect of sTWEAK on the lipid metabolism, we utilized lipid uptake assays (Figure 4). As shown in Figure 4A, PC-3 cells treated for 48 h with sTWEAK significantly increased the fatty acid uptake, and this effect was significantly blocked in cells pretreated with siFn14 before stimulation with sTWEAK. Notably, sTWEAK stimulation also increased lipid accumulation, as shown by Nile Red staining, Figure 4B).

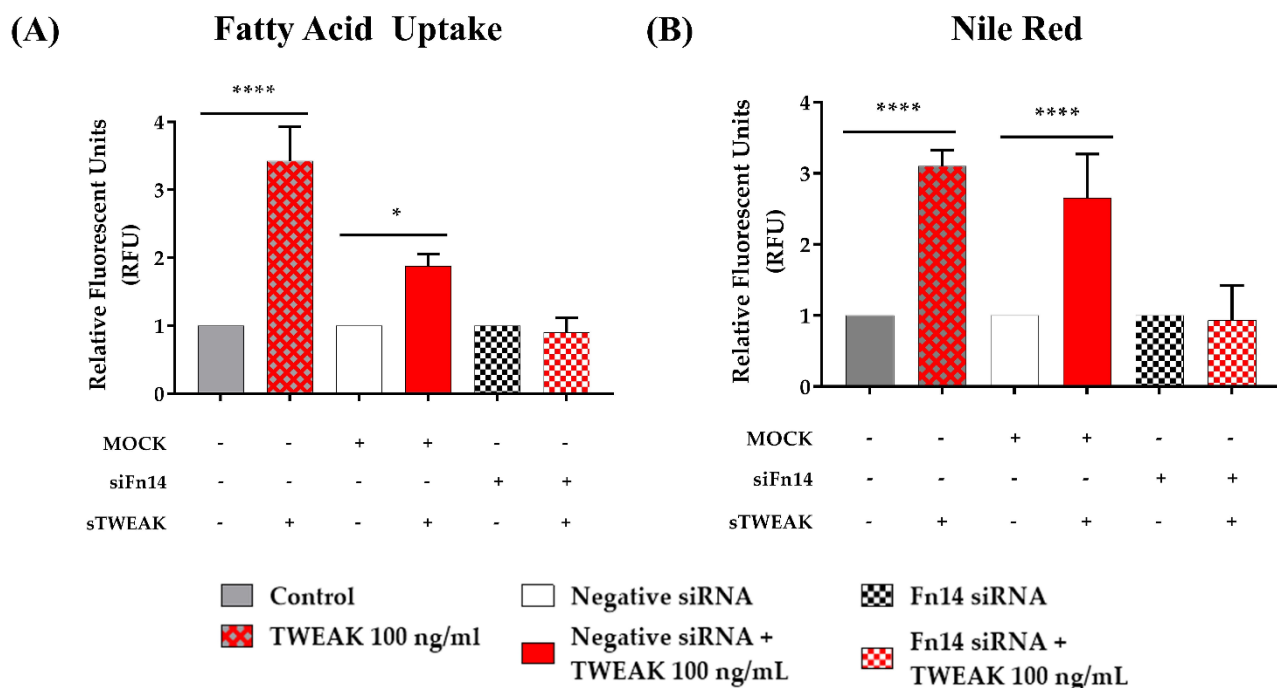


Figure 4. sTWEAK stimulation induces lipid uptake and accumulation in PC-3 cells. Cells were treated with 100 ng/mL TWEAK for 48 h. (A) Uptake of the fatty acid analog TF2-C12 was measured after 30 min. (B) Lipid accumulation was measured with Nile Red dye after 15 min of incubation. Fn14 was silenced in PC-3 cells using a Fn14 siRNA; a siRNA-negative sequence (MOCK) was used as a control. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 4$ experiments). Significant differences: * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$. Abbreviations: sTWEAK, soluble TNF-like weak inducer of apoptosis; siFn14, Fn14 small interfering RNA.

3.5. sTWEAK Stimulates Lipid Metabolism Genes in PC-3 Cells by Phosphorylating ERK1/2 and AKT(ser473)

Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K-AKT-mTORC1) pathway in cancer cells reprograms the cellular metabolism by augmenting the activity of metabolic enzymes [3]. Mitogen-activated phosphokinase (MAPK) signaling pathways have also been implicated in redirecting energy utilization in malignant cells [27]. Examination of MAPK signaling in sTWEAK-stimulated PC-3 cells revealed the activation (phosphorylation) of ERK1/2, but no changes were observed for p38 or JNK1/2 phosphorylation (Figure 5A). We also observed that sTWEAK induced AKT (ser473) phosphorylation in PC-3 cells (Figure 5B). Similar results were observed for LNCaP cells, but AKT (ser473) phosphorylation occurred after a 6-h exposure to sTWEAK (Figure S4 and its detailed information can be found in supplementary materials).

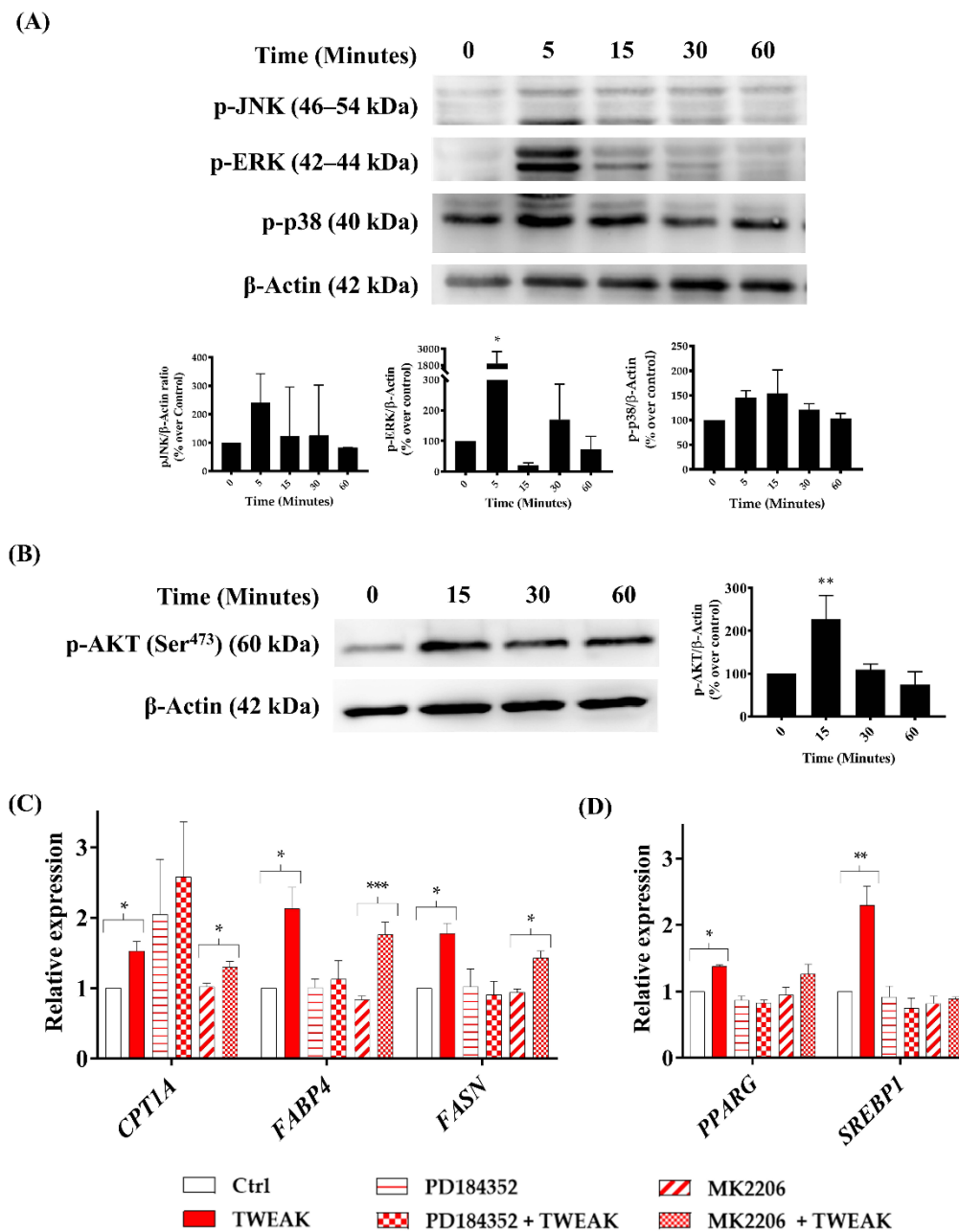


Figure 5. sTWEAK phosphorylates ERK1/2 and AKT(ser473) and regulates lipid-related gene expression in PC-3 cells. Cells were stimulated with 100 ng/mL sTWEAK at different time points. (A) MAPK and (B) AKT (ser473) phosphorylation were analyzed by Western blotting. Representative Western blots and a densitometry analysis of 3 independent experiments (mean ± SEM) are shown. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. PC-3 cells were treated with 10 μM ERK1/2 inhibitor (PD184352) or 1 μM AKT inhibitor (MK2206) and then stimulated with 100 ng/mL sTWEAK for 24 h. The gene expression of the (C) *CPT1A*, *FABP4* and *FASN* and (D) *PPARG* and *SREBP1* transcription factors were evaluated by RT-qPCR. The relative gene expression levels are shown normalized to their corresponding untreated controls. Data are expressed as the mean ± SEM ($n = 4$ experiments). Significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Detailed information about the Western blotting can be found in Figure S6. Abbreviations: p-JNK, phospho-Jun N-terminal Kinase; p-ERK, phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-p38, phospho- p38 mitogen-activated protein kinase, p-AKT, phospho- Protein kinase B; β-Actin, beta-actin; CPT1A, Carnitine palmitoyltransferase IA; FABP4, fatty acid-binding protein 4; FASN, Fatty acid synthase; SREBP1, Sterol regulatory element-binding transcription factor 1; PPARG, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; % over control: values are calculated as percentage over untreated cells at time 0; kDa, Kilodaltons; RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR.

To test whether these activated pathways were implicated in the control of the lipid metabolism genes after sTWEAK/Fn14 engagement, we pharmacologically inhibited ERK1/2 and AKT signaling in PC-3 cells. We observed that the expression of genes implicated in lipolysis (*CPT1*), lipid transport (*FABP4*) and de novo lipogenesis (*FASN*) were abolished only by the ERK1/2 inhibitor (Figure 5C), whereas the expression of the gene transcription regulators *SREBP-1* and *PPARG* were significantly regulated at the transcriptional level by both ERK1/2 (PD184352) and AKT (MK2206) inhibitors (Figure 5D).

sTWEAK/Fn14 binding can also activate NF- κ B canonical and noncanonical pathways in PC-3 cells (and in LNCaP cells; Figure S4); however, specific inhibitor experiments performed in PC-3 cells showed no implication of these pathways in the lipid metabolism (Figure S5).

4. Discussion

PCa remains one of the most prevalent cancers in men, and the accurate staging and detection of recurrent and metastatic disease remains a clinical challenge. Once detected, PCa can be treated with different approaches, including active surveillance, or with more aggressive surgical, radiation-based and other focal therapies [28]. All therapies used may have an impact on health-related quality of life. Most PCa cases follow an indolent course that would not threaten the duration or quality of life of patients, but tumor evolution is difficult to predict, as little is known about the factors that influence the onset of PCa or why some tumors progress from indolent to aggressive disease states.

Evaluating changes in metabolic biomarkers in relation to PCa diagnosis might be important to distinguish their contribution to cancer development. In this sense, we observed that hyperinsulinemia and insulin resistance measured by the HOMA-IR index were associated with PCa, as previously reported by others [29]. Hyperinsulinemia has also been reported as a risk factor in PCa development [8,30]. Additionally, the creatinine levels were higher in patients with PCa, but no association with the risk of developing PCa was observed in our cohort, although this association has been reported [31].

Here, we report that the serum levels of the proinflammatory cytokine TWEAK, which has previously been related to glucose metabolism [18], were lower in patients with PCa than in healthy controls. Interestingly, the reduced levels of sTWEAK together with higher levels of PSA, a higher HOMA-IR index and higher LDL cholesterol levels were associated with PCa in our cohort, indicating that TWEAK might be an important component of this pathology. As far as we know, there is no other evidence to suggest that serum sTWEAK concentrations are linked to PCa.

TWEAK is known to be present in the PCa microenvironment, particularly in semen, where its levels are reduced in high- versus low-risk patients [26]. Additionally, the reduced concentration of sTWEAK was inversely related to the expression of the Fn14 gene, a relationship that could explain an active ligand–receptor activity in situ [26]. The tumor metabolic changes induced by alterations of inflammatory cytokines in PCa have been poorly described. Accordingly, the study of PCa cancer cell metabolism, which is experiencing a renaissance in interest [32], under the effect of sTWEAK, might cast some light on the mechanistic understanding of tumorigenesis. Prostate tumor metabolism has been described to be highly lipogenic and lipolytic [33], with relatively low glucose uptake and glycolysis rates mainly in the early stages of PCa [34] compared with other solid tumors [5].

To test the possible metabolic actions of this cytokine on PCa cells, we used two established in vitro models of PCa disease: PC-3 cells (androgen-independent and invasive) and LNCaP cells (androgen-dependent and noninvasive). As a control for these studies, we used nontumorigenic RWPE-1 prostate epithelial cells [33]. LNCaP and PC3 cell lines can be models for different stages of prostate cancer. Our analysis of glucose metabolism-related genes in the studied cell lines revealed the reduced gene expression in the “preparatory phase” of glycolysis after sTWEAK treatment. By contrast, in PC-3 cells, sTWEAK administration caused a significant upregulation of genes of the “payoff

phase”, *PDHA1* and *PKM2*, which may render pyruvate as a substrate and favoring its entry into the mitochondria for conversion into citrate and, ultimately, fatty acids. A possible explanation for the differences in the expression of preparatory- and payoff-phase genes in PC-3 cells might be the use of glycerol for dihydroxyacetone phosphate synthesis and conversion to pyruvate (Figure 6).

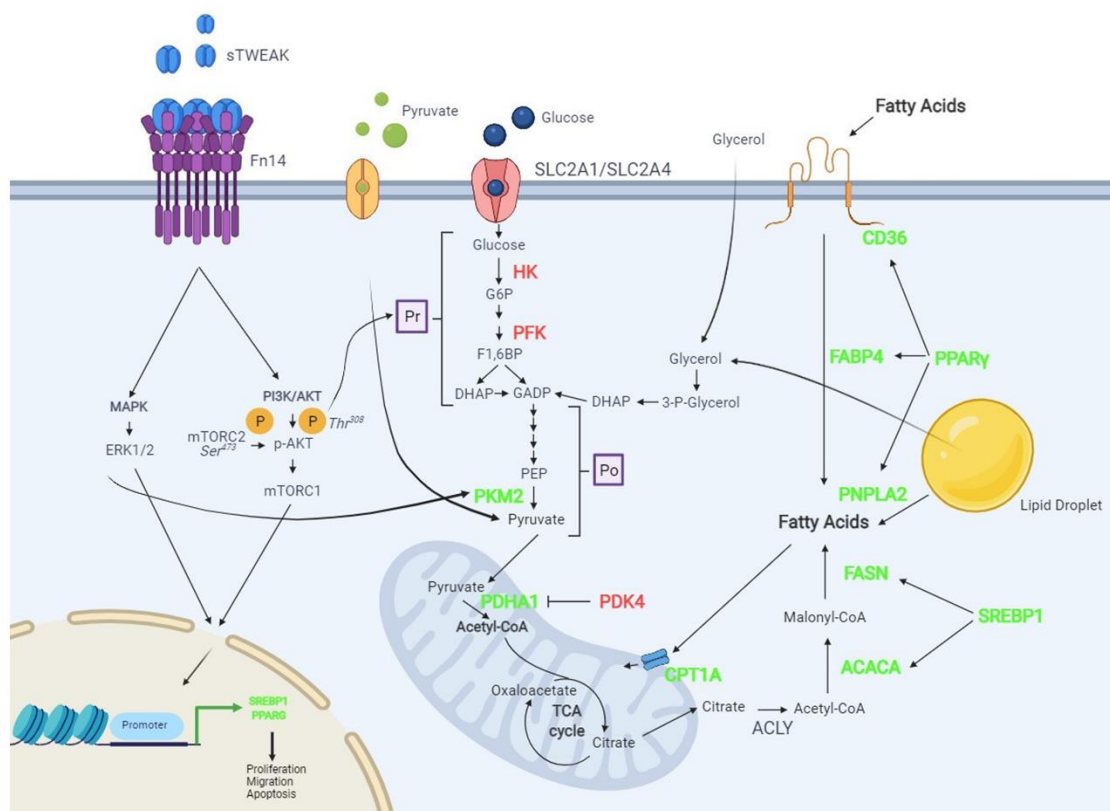


Figure 6. A scheme depicting the possible effects of the TWEAK/Fn14 axis on lipid and glucose metabolic pathways in PCa cells. TWEAK/Fn14 engagement phosphorylates AKT in ser473. PI3K-AKT-mTORC1 signaling is a key factor in controlling lipid and glucose metabolism. pAKT can regulate SREBP1 translocation to the nucleus, increasing ACLY, ACACA and FASN expression, potentiating de novo lipogenesis. AKT phosphorylation can also regulate PPARG, thus increasing the expression of the lipase PNPLA2, which catalyzes the breakdown of the ester bonds of fatty acids and activates lipolysis. Lipid entry and transport is also upregulated by PPARG through CD36 and FABP4 expression. CPT1A upregulation by sTWEAK would indicate that lipid oxidation in the mitochondria is boosted. De novo lipogenesis begins with citrate, which is generated by the conversion of pyruvate to acetyl-CoA mediated by an increase in the expression of PDHA1 and a decrease in PDK4 inhibitor expression, both actions regulated by sTWEAK/Fn14 engagement. Phosphorylation of ERK1/2 by sTWEAK/Fn14 engagement can regulate SREBP1 and PPARG and can also increase intracellular pyruvate concentrations by phosphorylating PKM2 and increasing its expression. The preliminary phase of glycolysis might be reduced, since HK and PFK expression is downregulated. Exogenous pyruvate can also be taken up. Glycerol may be an alternative source for pyruvate. Color pattern: green color represents upregulated genes and red downregulated genes; Created with BioRender.com. Abbreviations: PI3K, Phosphoinositide 3-kinase; AKT, protein kinase B; p-AKT, phosphorylated protein kinase B; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; TF, transcription factor; SLC2A1, glucose transporter 1, SLC2A4, glucose transporter 4; Pr, preparatory phase; HK, hexokinase; PFK, Phosphofructokinase; G6P, Glucose 6-phosphate; F1,6BP, Fructose-1,6-Biphosphate; DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; GADP, glyceraldehyde-3-phosphate; Po, Payoff phase; PEP, phosphoenolpyruvate; PKM2, Pyruvate kinase 2; PDHA1, Pyruvate dehydrogenase; PDK4, Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4; TCA, tricarboxylic acid; ACLY, ATP citrate synthase; ACACA, Acetyl-CoA Carboxylase Alpha; SREBP1, Sterol regulatory element-binding transcription factor 1; FASN, Fatty acid synthase; PNPLA2, patatin-like phospholipase 2; PPARG, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; FABP4, fatty acid-binding protein 4; CD36, cluster of differentiation 36; CPT1A, Carnitine palmitoyltransferase IA; 3-P-Glycerol, 3-phosphoglycerol.

Metabolic imaging of PCa tumors with labeled pyruvate [35] has been more useful than glucose, because PCa tumors show a relatively low glucose uptake [36]. Pyruvate can also be obtained by PCa cells through glycerol metabolism, because a higher activity of mitochondrial glycerol-3-phosphatedehydrogenase, which regulates cytosolic glycerol-3-phosphate (G3P), has been detected in PCa [37]. The use of glycerol by PCa cells has been indirectly demonstrated, because the enzyme monoacylglycerol lipase (MAGL), which converts monoacylglycerol into glycerol, has been shown to be upregulated in more aggressive PCa cell lines [38]. Glycerol can also be externally provided to tumor cells by PCa adipose tissue, as adipocytes treated with PCa-conditioned media increase their levels of PNPLA2 and secrete large amounts of free glycerol that may enter the PCa cells, fueling lipid metabolism [39] (Figure 6).

Of note, although sTWEAK does not positively regulate genes implicated in glucose metabolism in the studied PCa cells, glucose uptake experiments have demonstrated a low basal glucose metabolism in PCa cells versus a dominant fatty acid uptake [40,41], suggesting that fatty acids intake should be envisaged as target for further therapeutic PCa treatment [42].

Deregulation of lipogenic enzymes in PCa correlates with worse prognosis and poor survival [43]. sTWEAK treatment of PC-3 cells upregulated de novo lipogenesis, as evidenced by an increase in *ACACA* and *FASN* gene expression. Both genes are involved in the conversion of mitochondrial-derived citrate to fatty acids. This was accompanied by an increase in the expression of master key lipid regulatory genes such as *SREBP-1* and *PPARG* and by upregulation of the lipid membrane transporter gene *CD36* and the cytoplasmic fatty acid-binding protein *FABP4*. Consistent with this finding, we found a concordant sTWEAK-induced increase in cellular lipids and enhanced fatty acid uptake. The upregulation of *FASN* expression by sTWEAK is particularly relevant, as it can act as an oncogene in PCa [44], and *FASN* protein overexpression has been linked to poor recurrence-free survival in PCa [45]. Fatty acid oxidation is also reported to be deregulated in cancer cells [46], and, in this scenario, sTWEAK might upregulate this lipolytic process by increasing *CPT1* expression in the mitochondria and *PNPLA2* expression in the cytoplasm, both reported to be deregulated in PCa [47,48].

The enhancing effect of sTWEAK on lipid metabolism gene expression in the PC-3 cellular model was mediated by binding to the Fn14 receptor, which was paralleled by an increase in the corresponding protein expression. Overall, our observations suggest that sTWEAK treatment in PC-3 cells stimulates cells to obtain energy by the oxidation of fatty acids. Therefore, since lipid metabolism may confer more aggressive properties to malignant cancer cells [49], sTWEAK may be potentiating an aggressive PCa progression.

Several signaling cascades activated by TWEAK/Fn14 are implicated in PCa, including the canonical and noncanonical NF- κ B signaling pathways and MAPKs [50]. Of the three known MAPK pathways—extracellular signal-regulated kinases (ERKs), c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and p38 kinases [51]—only ERKs and JNKs have been shown to be key metabolic regulators in malignant cells [27]. We found that TWEAK activates the ERK1/2 pathway in PCa cells, influencing the cellular metabolism. This effect could be mediated by phosphorylating PKM2 [27], which, in turn, can regulate SREBP-1 expression, a key regulator of lipid metabolism in several cancer types [52] (Figure 6).

Activation of the PI3K-AKT-mTORC1 pathway is important in the regulation of lipid and glucose metabolisms [53,54]. sTWEAK treatment of PCa cells phosphorylates AKT at serine473, known to be mediated by mTORC2 [55] (Figure 6). The mechanistic links between Akt and SREBP on the lipid metabolism are well-known [56]. Of note, the timing of activation differed between PC-3 and LNCaP, being a late event in the former. This distinctive signaling trait between the two PCa lines in the present study might, in part, explain the differences observed in lipid gene expression.

We are aware that cell line-based studies have inherent limitations, as they likely do not represent the heterogeneity observed in PCa, but they are nevertheless useful tools to explore the mechanisms underlying tumorigenesis and drug resistance. Future studies with

patient-derived cancer models, which are more representative of the original tumor [57], will be needed as the next step to explore the mechanistic relationship between the cytokine TWEAK and lipid metabolism in PCa.

5. Conclusions

Our results lead us to conclude that reduced serum levels of sTWEAK are independently associated with an increased risk of PCa. Additionally, we established that the presence of sTWEAK in the PCa microenvironment contributes to PCa lipid metabolism by modulating the expression of lipid-related genes, thus potentiating an aggressive progression. Since the inhibition of TWEAK/Fn14 engagement can block this metabolic effect in vitro, targeting Fn14 might be a therapeutic strategy for the management of PCa.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13184688/s1>, Figure S1: *FN14* gene expression in all the studied PCa cell lines (PC-3, LNCaP and RWPE-1). Figure S2: sTWEAK on the protein expression of CPT1A, FABP4 and FASN. Figure S3: Complete Western blotting results, referring to Figure 3. Figure S4: Effect of sTWEAK stimulation on several signaling pathways in the PCa cell models. Figure S5: PC-3 cells were treated with inhibitors of noncanonical and canonical NK-kB signaling. Figure S6: Complete Western blotting results, referring to Figure 5.

Author Contributions: Conceptualization, M.R.C., J.S.-T. and X.R.-P.; methodology, A.A.-C. and M.A.-S.; formal analysis, M.R.C. and A.A.-C.; writing—review and editing, M.R.C., X.R.-P., J.S.-T. and A.A.-C. and funding acquisition, M.R.C. and X.R.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was founded by Instituto de Salud Carlos III through projects PI17/00877 and PI20/00418 (co-funded by the European Regional Development Fund/European Social Fund, “A way to make future”/“Investing in your future”). No payment was received to write this article by a pharmaceutical company or other agency.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of Institut d’Investigació Sanitària Pere Virgili (Ref. CEIM 171/2017; Ref. CEIM205/2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: We wish to acknowledge the patients enrolled in this study for their participation and the IISPV BioBanc (B.0000853 + B.0000854) integrated in the Spanish National Biobanks Platform (PT13/0010/0029 and PT13/0010/0062) for its collaboration.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Epstein, J.I.; Egevad, L.; Amin, M.B.; Delahunt, B.; Srigley, J.R.; Humphrey, P.A. 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.* **2016**, *40*, 244–252. [[CrossRef](#)]
3. Koundouros, N.; Poulogiannis, G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 4–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fernández, L.P.; Gómez de Cedrón, M.; Ramírez de Molina, A. Alterations of Lipid Metabolism in Cancer: Implications in Prognosis and Treatment. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 577420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bader, D.A.; McGuire, S.E. Tumour metabolism and its unique properties in prostate adenocarcinoma. *Nat. Rev. Urol.* **2020**, *17*, 214–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zadra, G.; Photopoulos, C.; Loda, M. The fat side of prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1831*, 1518–1532. [[CrossRef](#)]
7. Saboori, S.; Rad, E.Y.; Birjandi, M.; Mohiti, S.; Falahi, E. Serum insulin level, HOMA-IR and prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2019**, *13*, 110–115. [[CrossRef](#)]

8. Nandeesh, H. Insulin: A novel agent in the pathogenesis of prostate cancer. *Int. Urol. Nephrol.* **2009**, *41*, 267–272. [[CrossRef](#)]
9. Sfanos, K.S.; De Marzo, A.M. Prostate cancer and inflammation: The evidence. *Am. J. Pathol.* **2012**, *60*, 199–215. [[CrossRef](#)]
10. Maecker, H.; Varfolomeev, E.; Kischkel, F.; Lawrence, D.; LeBlanc, H.; Lee, W.; Hurst, S.; Danilenko, D.; Li, J.; Filvaroff, E.; et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* **2005**, *123*, 931–944. [[CrossRef](#)]
11. Chicheportiche, Y.; Bourdon, P.R.; Xu, H.; Hsu, Y.M.; Scott, H.; Hession, C.; Garcia, I.; Browning, J.L. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32401–32410. [[CrossRef](#)]
12. Winkles, J.A. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: Discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 411–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wiley, S.R.; Winkles, J.A. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 241–249. [[CrossRef](#)]
14. Narita, S.N.; Tsuchiya, N.; Saito, M.; Inoue, T.; Kumazawa, T.; Yuasa, T.; Nakamura, A.; Habuchi, T. Candidate Genes Involved in Enhanced Growth of Human Prostate Cancer Under High Fat Feeding. Identified by Microarray Analysis. *Prostate* **2008**, *68*, 321–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Huang, M.; Narita, S.; Tsuchiya, N.; Ma, Z.; Numakura, K.; Obara, T.; Tsuruta, H.; Saito, M.; Inoue, T.; Horikawa, Y.; et al. Overexpression of Fn14 promotes androgen-independent prostate cancer progression through MMP-9 and correlates with poor treatment outcome. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1589–1596. [[CrossRef](#)]
16. Ruiz-Plazas, X.; Rodríguez-Gallego, E.; Alves, M.; Altuna-Coy, A.; Lozano-Bartolomé, J.; Portero-Otin, M.; García-Fontgivell, J.F.; Martínez-González, S.; Segarra, J.; Chacón, M.R. Biofluid quantification of TWEAK/Fn14 axis in combination with a selected biomarker panel improves assessment of prostate cancer aggressiveness. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ruiz-Plazas, X.; Altuna-Coy, A.; Alves-Santiago, M.; Vila-Barja, J.; García-Fontgivell, J.F.; Martínez-González, S.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R. Liquid biopsy-based exo-oncomirnas can predict prostate cancer aggressiveness. *Cancers* **2021**, *13*, 250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Vendrell, J.; Chacón, M.R. TWEAK: A new player in obesity and diabetes. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 488. [[CrossRef](#)]
19. Lozano-Bartolomé, J.; Llauro, G.; Rodríguez, M.M.; Fernandez-Real, J.M.; Garcia-Fontgivell, J.F.; Puig, J.; Maymó-Masip, E.; Vendrell, J.; Chacón, M.R. Reduced circulating levels of sTWEAK are associated with NAFLD and may affect hepatocyte triglyceride accumulation. *Int. J. Obes.* **2016**, *40*, 1337–1345. [[CrossRef](#)]
20. Preston, M.A.; Batista, J.L.; Wilson, K.M.; Carlsson, S.V.; Gerke, T.; Sjöberg, D.D.; Dahl, D.M.; Sesso, H.D.; Feldman, A.S.; Gann, P.H.; et al. Baseline prostate-specific antigen levels in midlife predict lethal prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2705–2711. [[CrossRef](#)]
21. Chen, S.; Liu, J.; Yang, M.; Lai, W.; Ye, L.; Chen, J.; Hou, X.; Ding, H.; Zhang, W.; Wu, Y.; et al. Fn14, a downstream target of the TGF- β signaling pathway, regulates fibroblast activation. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pereira, S.S.; Monteiro, M.P.; Costa, M.M.; Ferreira, J.; Alves, M.G.; Oliveira, P.F.; Jarak, I.; Pignatelli, D. MAPK/ERK pathway inhibition is a promising treatment target for adrenocortical tumors. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 894–906. [[CrossRef](#)]
23. Tee, S.S.; Suster, I.; Truong, S.; Jeong, S.; Eskandari, R.; DiGialleonardo, V.; Alvarez, J.A.; Aldeborgh, H.N.; Keshari, K.R. Targeted AKT inhibition in prostate cancer cells and spheroids reduces aerobic glycolysis and generation of hyperpolarized [1- ^{13}C] lactate. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16*, 453–460. [[CrossRef](#)]
24. Sun, Y.; St Clair, D.K.; Xu, Y.; Crooks, P.A.; St Clair, W.H. A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 2880–2890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Henry, K.L.; Kellner, D.; Bajrami, B.; Anderson, J.E.; Beyna, M.; Bhisetti, G.; Cameron, T.; Capacci, A.G.; Bertolotti-Ciarlet, A.; Feng, J.; et al. CDK12-mediated transcriptional regulation of noncanonical NF- κ B components is essential for signaling. *Sci. Signal.* **2018**, *11*, eaam8216. [[CrossRef](#)]
26. Vendrell, J.; Maymó-Masip, E.; Tinahones, F.; García-España, A.; Megia, A.; Caubet, E.; García-Fuentes, E.; Chacón, M.R. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: Up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 2983–2992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Papa, S.; Choy, P.M.; Bubici, C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene* **2019**, *38*, 2223–2240. [[CrossRef](#)]
28. Cooperberg, M.R.; Carroll, P.R.; Klotz, L. Active surveillance for prostate cancer: Progress and promise. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 3669–3676. [[CrossRef](#)]
29. Di Sebastiano, K.M.; Pinthus, J.H.; Duivenvoorden, W.C.M.; Mourtzakis, M. Glucose impairments and insulin resistance in prostate cancer: The role of obesity, nutrition and exercise. *Obes. Rev.* **2018**, *19*, 1008–1016. [[CrossRef](#)]
30. Hammarsten, J.; Högstedt, B. Hyperinsulinaemia: A prospective risk factor for lethal clinical prostate cancer. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2887–2895. [[CrossRef](#)]
31. Weinstein, J.E.; Mackrain, K.; Stolzenberg-Solomon, R.-Z.; Selhub, J.; Virtamo, J.; Albanes, D. Serum creatinine and prostate cancer risk in a prospective study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2009**, *18*, 2643–2649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Harris, A.L. Development of cancer metabolism as a therapeutic target: New pathways, patient studies, stratification and combination therapy. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 1–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Butler, L.M.; Centenera, M.M.; Swinnen, J.V. Androgen control of lipid metabolism in prostate cancer: Novel insights and future applications. *Endocr. Relat. Cancer* **2014**, *23*, R219–R227. [[CrossRef](#)]

34. Jadvar, H. PET of glucose metabolism and cellular proliferation in prostate cancer. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 25S–29S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Beauregard, J.M.; Williams, S.G.; Degrado, T.R.; Roselt, P.; Hicks, R.J. Pilot comparison of 18F-fluorocholine and 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT with conventional imaging in prostate cancer. *J. Med. Imaging Radiat. Oncol.* **2010**, *54*, 325–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Aggarwal, R.; Vigneron, D.B.; Kurhanewicz, J.; Francisco, S. Hyperpolarized 1-[13C]-Pyruvate Magnetic Resonance Imaging Detects an Early Metabolic Response to Androgen Ablation Therapy in Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2017**, *72*, 1028–1029. [[CrossRef](#)]
37. Pecinová, A.; Alán, L.; Brázdová, A.; Vrbacký, M.; Pecina, P.; Drahot, Z.; Houštek, J.; Mráček, T. Role of Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in Metabolic Adaptations of Prostate Cancer. *Cells* **2020**, *9*, 1764. [[CrossRef](#)]
38. Nomura, D.K.; Lombardi, D.P.; Chang, J.W.; Niessen, S.; Ward, A.M.; Long, J.Z.; Hoover, H.H.; Cravatt, B.F. Monoacylglycerol lipase exerts dual control over endocannabinoid and fatty acid pathways to support prostate cancer. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 846–856. [[CrossRef](#)]
39. Diedrich, J.D.; Rajagurubandara, E.; Herroon, M.K.; Mahapatra, G.; Hüttemann, M.; Podgorski, I. Bone marrow adipocytes promote the warburg phenotype in metastatic prostate tumors via HIF-1 α activation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 64854–64877. [[CrossRef](#)]
40. Liu, Y.; Zuckier, L.S.; Ghesani, N.V. Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: A potential new diagnostic and therapeutic approach. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 369–374.
41. Dueregger, A.; Schöpf, B.; Eder, T.; Höfer, J.; Gnaiger, E.; Aufinger, A.; Kenner, L.; Perktold, B.; Ramoner, R.; Klocker, H.; et al. Differential utilization of dietary fatty acids in benign and malignant cells of the prostate. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135704. [[CrossRef](#)]
42. Liu, Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2006**, *9*, 230–234. [[CrossRef](#)]
43. Dang, Q.; Chen, Y.-A.; Hsieh, J.-T. The dysfunctional lipids in prostate cancer. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* **2019**, *7*, 273–280.
44. Loda, M.; Migita, T.; Ruiz, S.; Fornari, A.; Fiorentino, M.; Priolo, C.; Zadra, G.; Inazuka, F.; Grisanzio, C.; Palescandolo, E.; et al. Fatty acid synthase: A metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 519–532. [[CrossRef](#)]
45. Cao, Z.; Xu, Y.; Guo, F.; Chen, X.; Ji, J.; Xu, H.; He, J.; Yu, Y.; Sun, Y.; Lu, X.; et al. FASN Protein Overexpression Indicates Poor Biochemical Recurrence-Free Survival in Prostate Cancer. *Dis. Markers* **2020**, *2020*, 3904947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Rhodes, D.R.; Yu, J.; Shanker, K.; Deshpande, N.; Varambally, R.; Ghosh, D.; Barrette, T.; Pandey, A.; Chinnaiyan, A.M. ONCOMINE: A Cancer Microarray Database and Integrated Data-Mining Platform. *Neoplasia* **2004**, *6*, 1–6. [[CrossRef](#)]
47. Schlaepfer, I.R.; Rider, L.; Rodrigues, L.U.; Gijón, M.A.; Colton, T.; Romero, L.; Cimic, A.; Sirintrapun, S.J.; Glodé, L.M.; Robert, H.; et al. Lipid catabolism via CPT1 as a therapeutic target for prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 2361–2371. [[CrossRef](#)]
48. Mitra, R.; Le, T.T.; Gorjala, P.; Goodman, O.B. Positive regulation of prostate cancer cell growth by lipid droplet forming and processing enzymes DGAT1 and ABHD5. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 631. [[CrossRef](#)]
49. Luo, X.; Cheng, C.; Tan, Z.; Li, N.; Tang, M.; Yang, L.; Cao, Y. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 1–10. [[CrossRef](#)]
50. Yin, J.; Morrissey, C.; Barrett, B.; Corey, E.; Ylaya, K.; Hewitt, S.; Fang, L.; Tillman, H.; Lake, R.; Vessella, R.; et al. AR-Regulated TWEAK-FN14 Pathway Promotes Prostate Cancer Bone Metastasis. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 4306–4317. [[CrossRef](#)]
51. Cargnello, M.; Roux, P.P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75*, 50–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Tao, T.; Su, Q.; Xu, S.; Deng, J.; Zhou, S.; Zhuang, Y.; Huang, Y.; He, C.; He, S.; Peng, M.; et al. Down-regulation of PKM2 decreases FASN expression in bladder cancer cells through AKT/mTOR/SREBP-1c axis. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 3088–3104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hoxhaj, G.; Manning, B. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **2020**, *20*, 74–88. [[CrossRef](#)]
54. Götting, I.; Jendrossek, V.; Matschke, J. A new twist in protein kinase b/akt signaling: Role of altered cancer cell metabolism in akt-mediated therapy resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8563. [[CrossRef](#)]
55. Manning, B.D.; Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, *169*, 381–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Krycer, J.R.; Sharpe, L.J.; Luu, W.; Brown, A.J. The Akt-SREBP nexus: Cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21*, 268–276. [[CrossRef](#)]
57. Namekawa, T.; Ikeda, K.; Horie-Inoue, K.; Inoue, S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells* **2019**, *8*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplementary Materials

Serum Levels of the Cytokine TWEAK Are Associated with Metabolic Status in Patients with Prostate Cancer and Modulate Cancer Cell Lipid Metabolism In Vitro

Antonio Altuna-Coy, Xavier Ruiz-Plazas, Marta Alves-Santiago, José Segarra-Tomás and Matilde R. Chacón

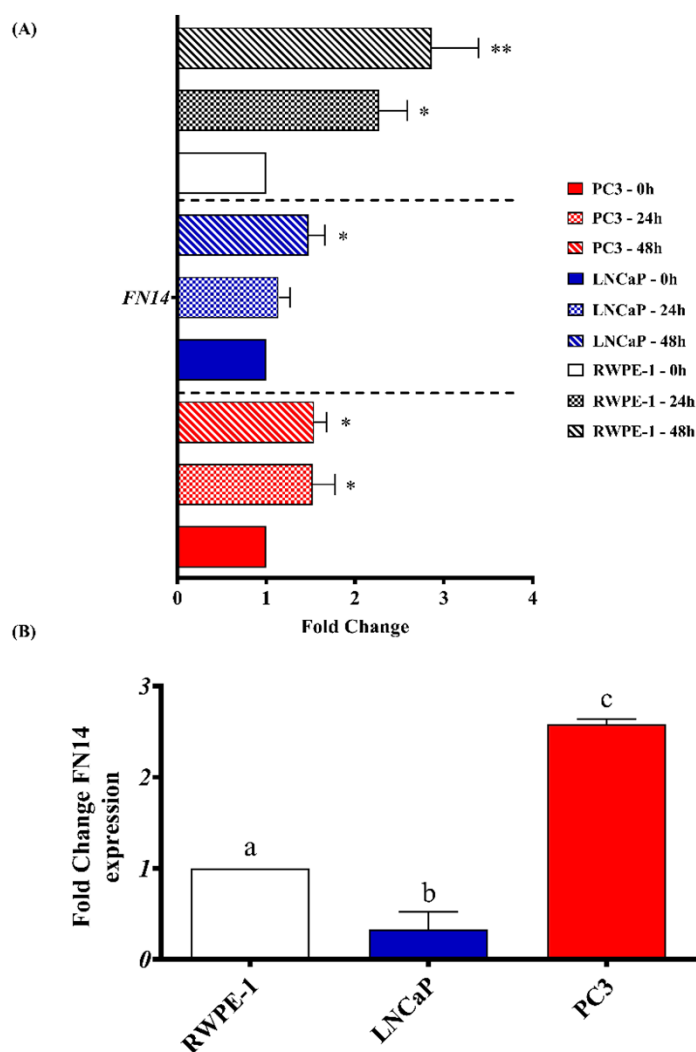


Figure S1. *FN14* gene expression in all the studied PCa cell lines (PC-3, LNCaP and RWPE-1). **(A)** *Fn14* gene expression before and after 100ng/mL sTWEAK treatment at 24 h and 48 h. Fold change represented vs. its corresponding untreated condition. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. **(B)** *Fn14* gene expression. Basal levels. Different lettering over the boxes indicates statistical differences. Significant differences are established at $p < 0.05$. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n = 4$ experiments). Abbreviations: FN14, fibroblast growth factor-inducible 14; PC-3, androgen-independent human advanced adenocarcinoma prostate cancer cell line, LNCaP, androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cell line; RWPE-1 epithelial cell line derived from the peripheral zone of a histologically normal adult human prostate.

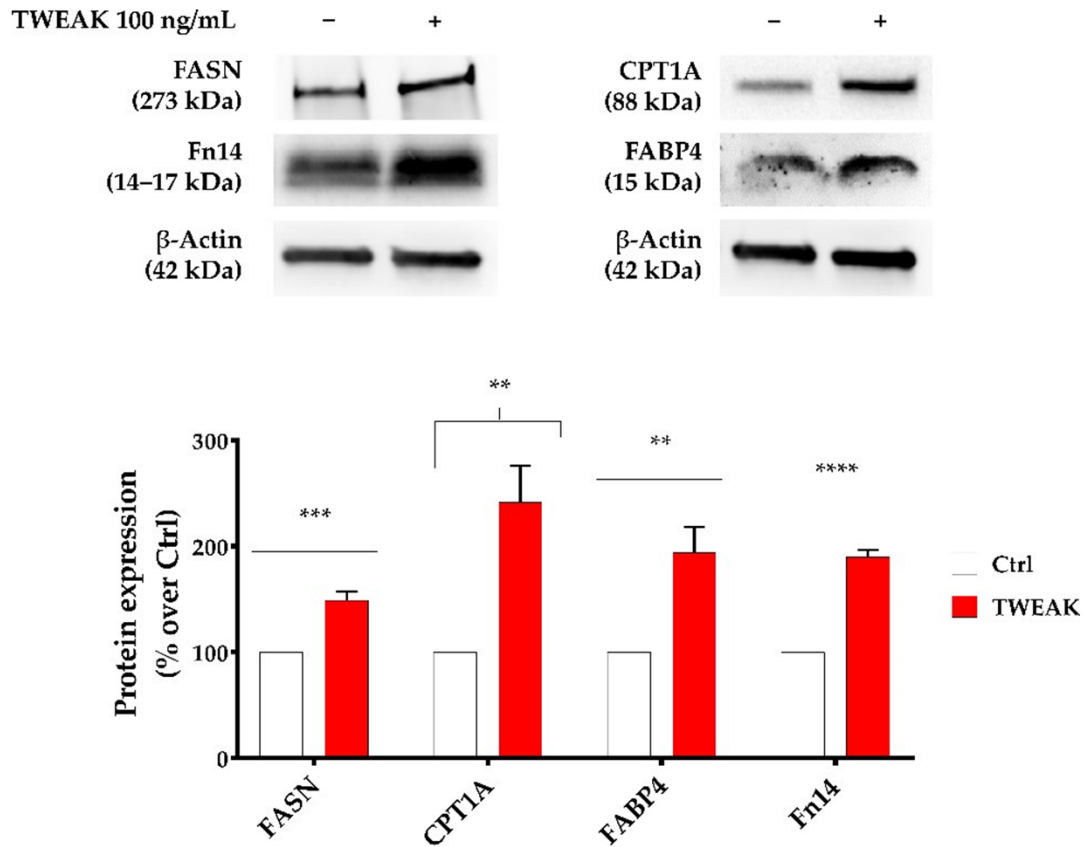


Figure S2. sTWEAK on the protein expression of CPT1A, FABP4 and FASN. PC-3 cells were stimulated with sTWEAK 100 ng/mL during 48 h. The protein was analyzed by Western blotting. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Abbreviations: TWEAK, TNF-like weak inducer of apoptosis; FASN, Fatty acid synthase, CPT1A, Carnitine palmitoyltransferase IA; FABP4, fatty acid-binding protein 4; KDa, Kilodant; β -Actin, beta-actin; FN14, fibroblast growth factor-inducible 14; % over control: values are calculated as percentage over untreated cells (Ctrl) at time 0.

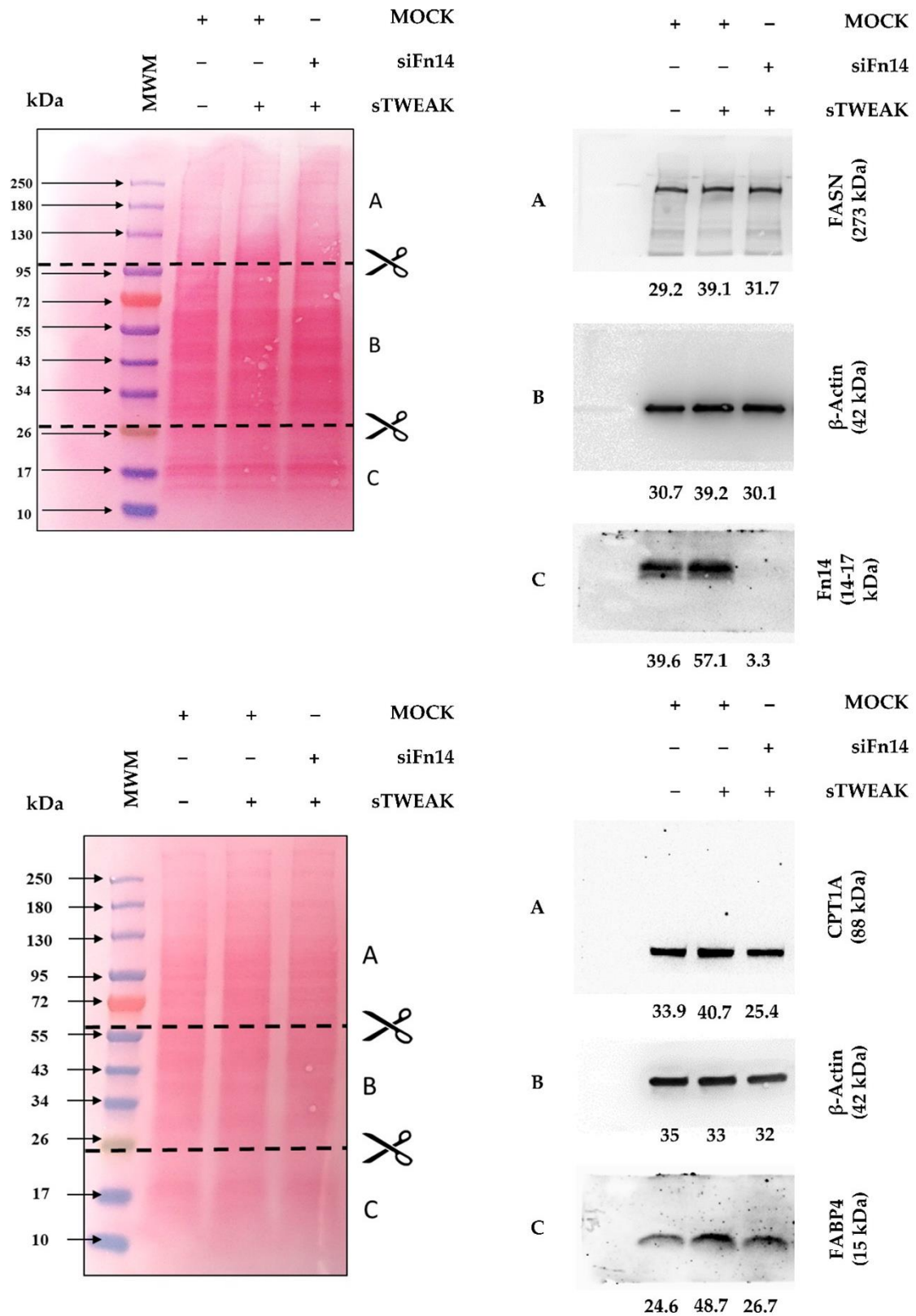


Figure S3. Complete WB results, referring to Figure 3. The numbers below the membranes represent the percentage of the intensity. Abbreviations: MOCK, siRNA negative control; siFn14, Fn14 small interfering RNA, sTWEAK, soluble TNF-like weak inducer of apoptosis; MWM, Molecular Weight Markers; CPT1A, CPT1A, Carnitine palmitoyltransferase IA; Fn14, fibroblast growth factor-inducible 14; FABP4, fatty acid-binding protein 4; FASN, Fatty acid synthase; kDa, Kilodaltons. Symbols: Scissor/dotted lines: position where membrane was cut and incubated with antibodies as indicated in each panel.

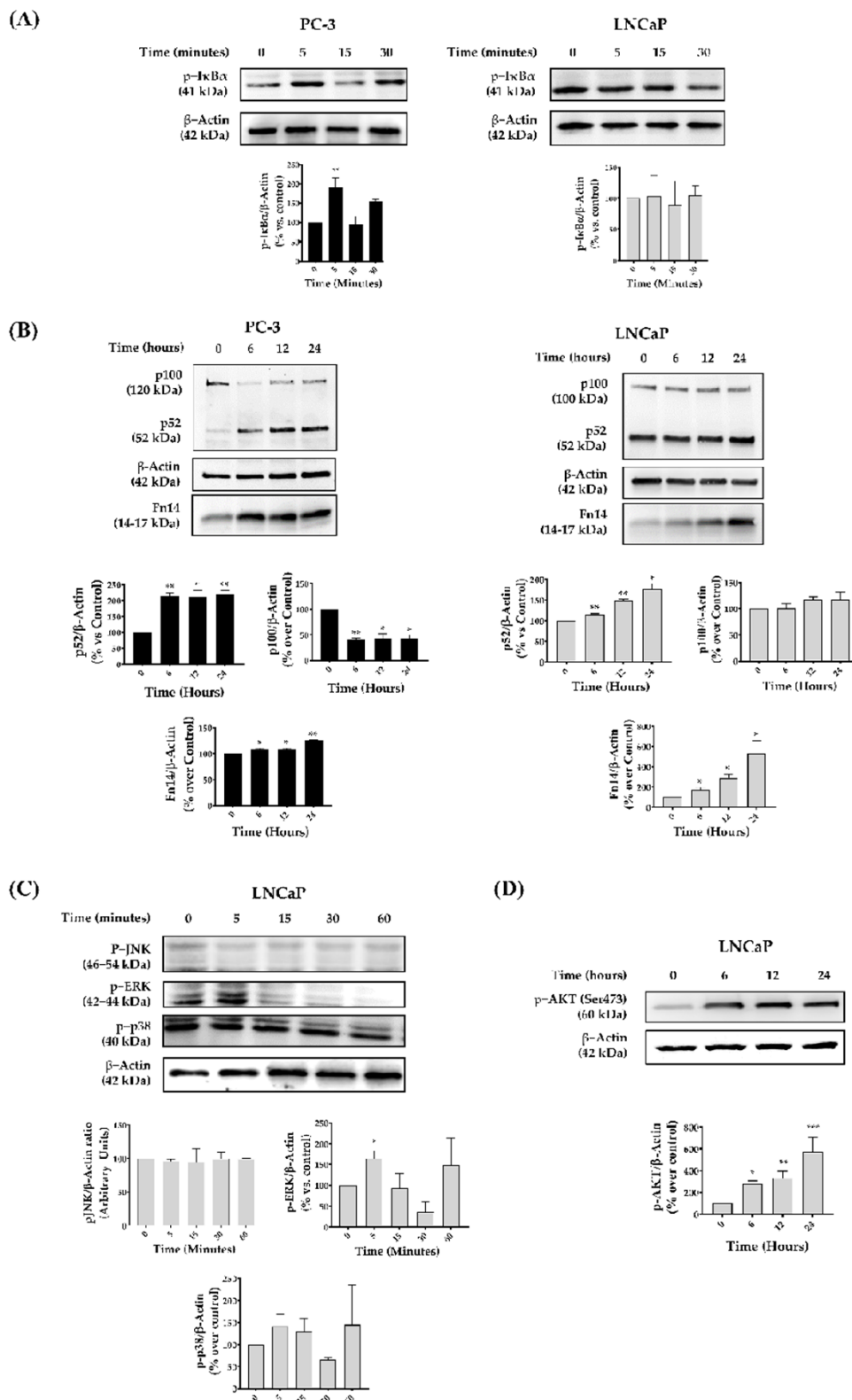


Figure S4. Effect of sTWEAK stimulus on several signaling pathways in the PCa cell models. PC-3 and LNCaP cells lines were stimulated with 100ng/mL sTWEAK at different time points. (A) Canonical NF-κB. (B) Noncanonical NF-κB. (C) MAPK pathway. (D) AKT phosphorylation. Representative immunoblots of 4 independent experiments (means ± SEM) are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$. Abbreviations: p-IK β , phospho-nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha; p-100, Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit; p-52, Nuclear factor NF-kappa-B p52 subunit, β-Actin, beta-actin; Fn14, fibroblast growth factor-inducible 14; p-JNK, phospho-Jun N-terminal Kinase; p-ERK, phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-p38, phospho- p38 mitogen-activated protein kinase, p-AKT, phospho- Protein kinase B; % over control: values are calculated as percentage over untreated cells at time 0; PC-3, androgen-independent human advanced adenocarcinoma prostate cancer cell line, LNCaP, androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cell line.

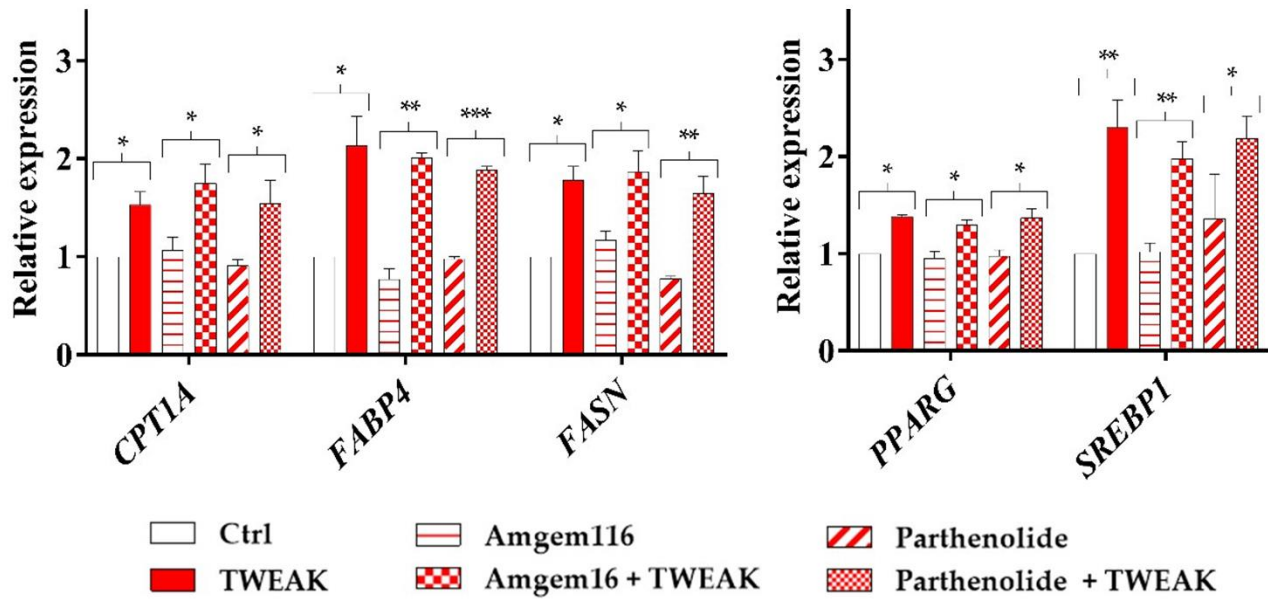


Figure S5. PC-3 cells were treated noncanonical and canonical inhibitors with NF- κ B signaling. The cells were treated with 10 μ M of a noncanonical NF- κ B inhibitor (Amgem) or 10 μ M of canonical NF- κ B inhibitor (parthenolide) and then stimulated with 100-ng/mL sTWEAK for 24 hours. The gene expression of *CPT1A*, *FABP4*, *FASN* and *PPARG* and *SREBP1* were evaluated by RT-qPCR. The relative gene expression levels are shown normalized to their corresponding untreated control. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n = 4$ experiments). Significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Abbreviations: TWEAK, TNF-like weak inducer of apoptosis; CPT1A, Carnitine palmitoyltransferase IA; FABP4, fatty acid-binding protein 4; FASN, Fatty acid synthase; SREBP1, Sterol regulatory element-binding transcription factor 1; PPARG, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR.

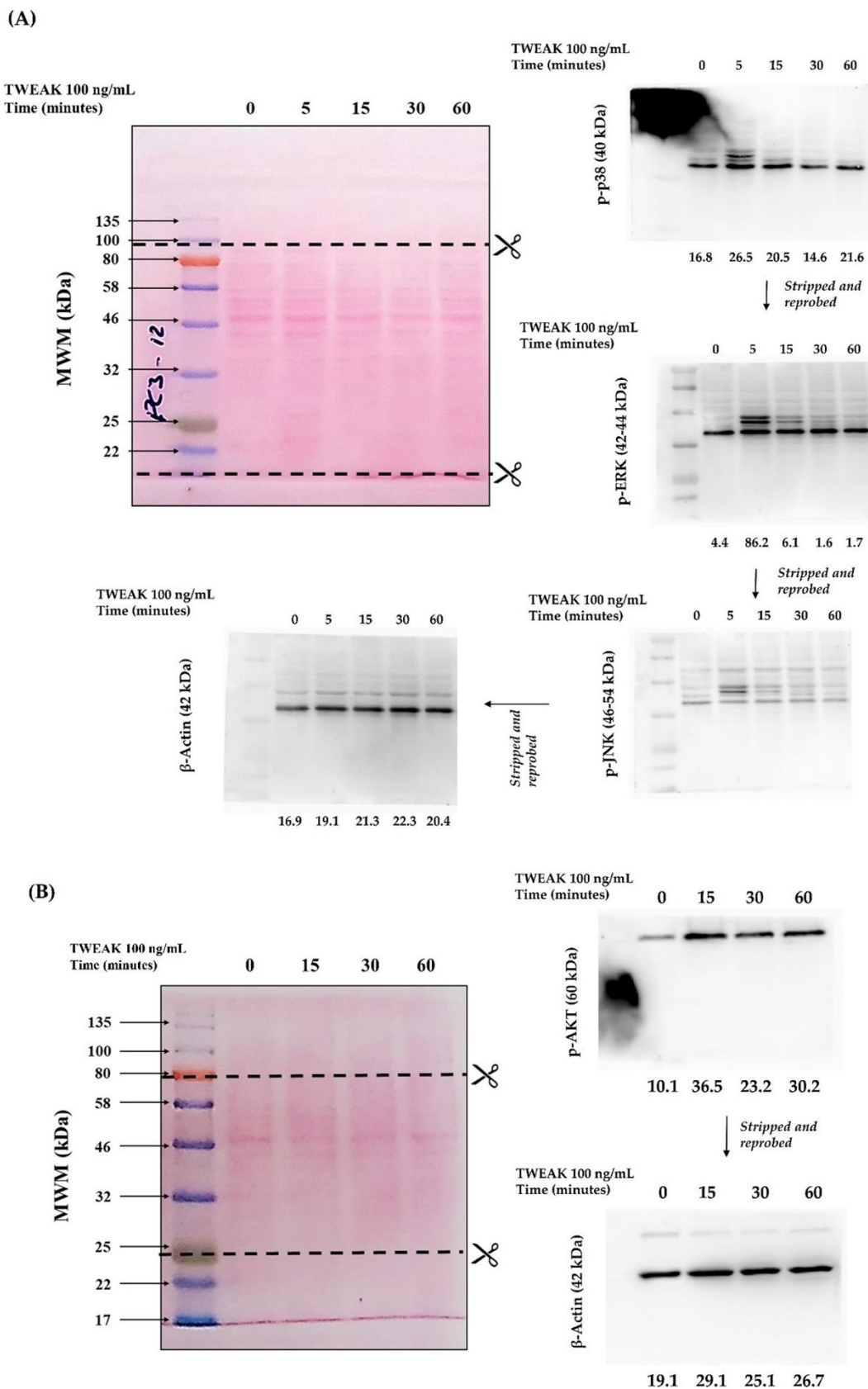
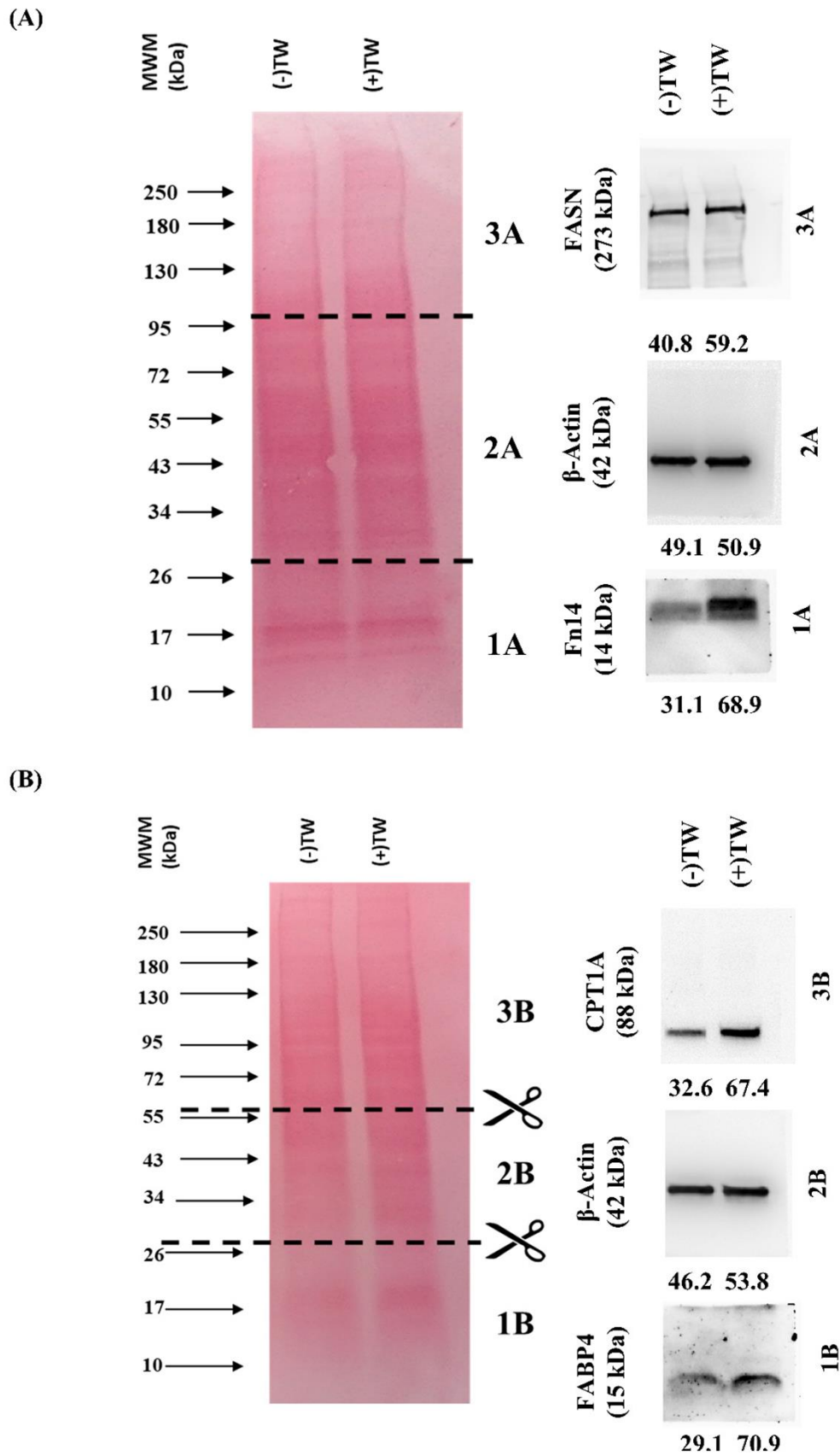
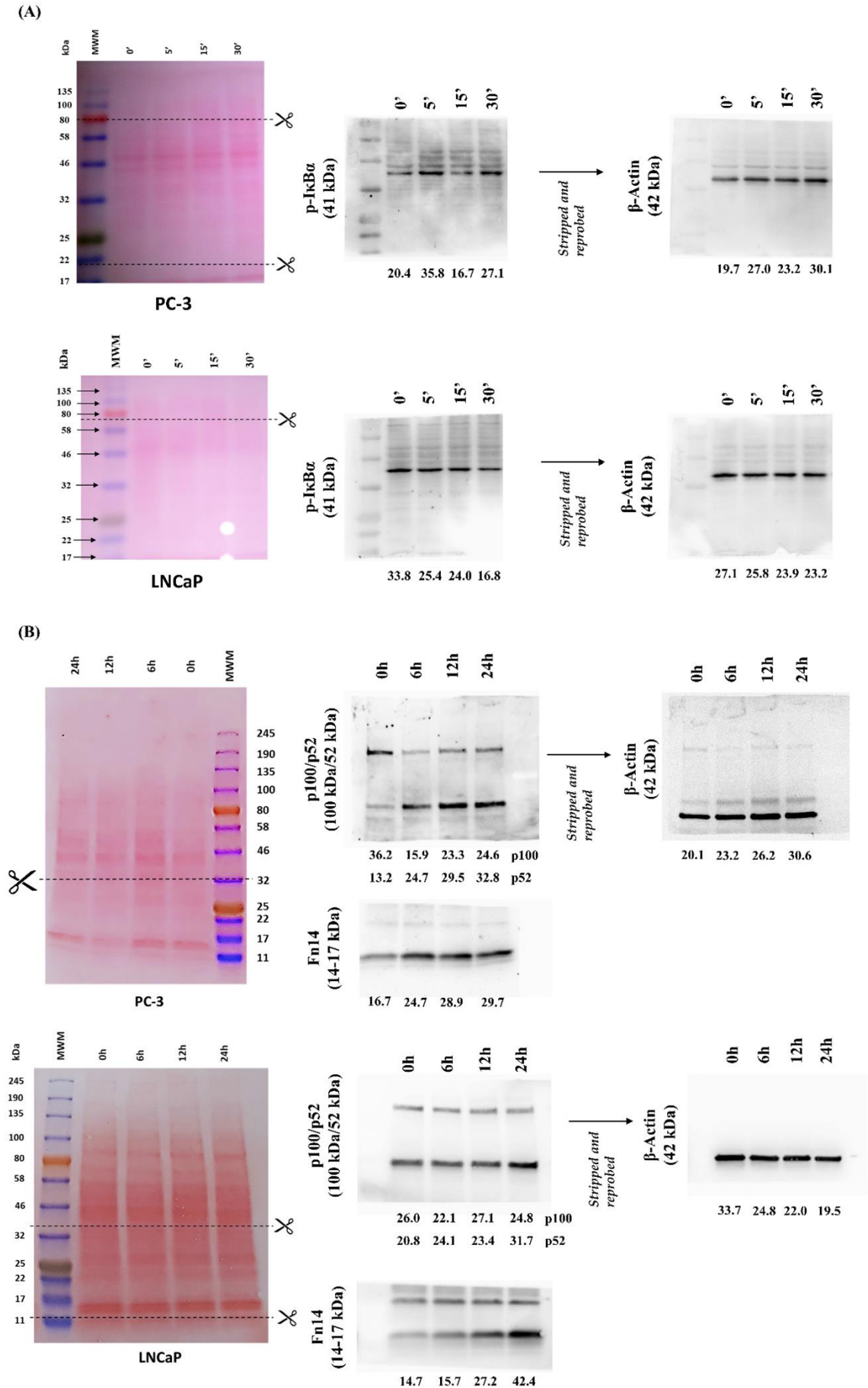
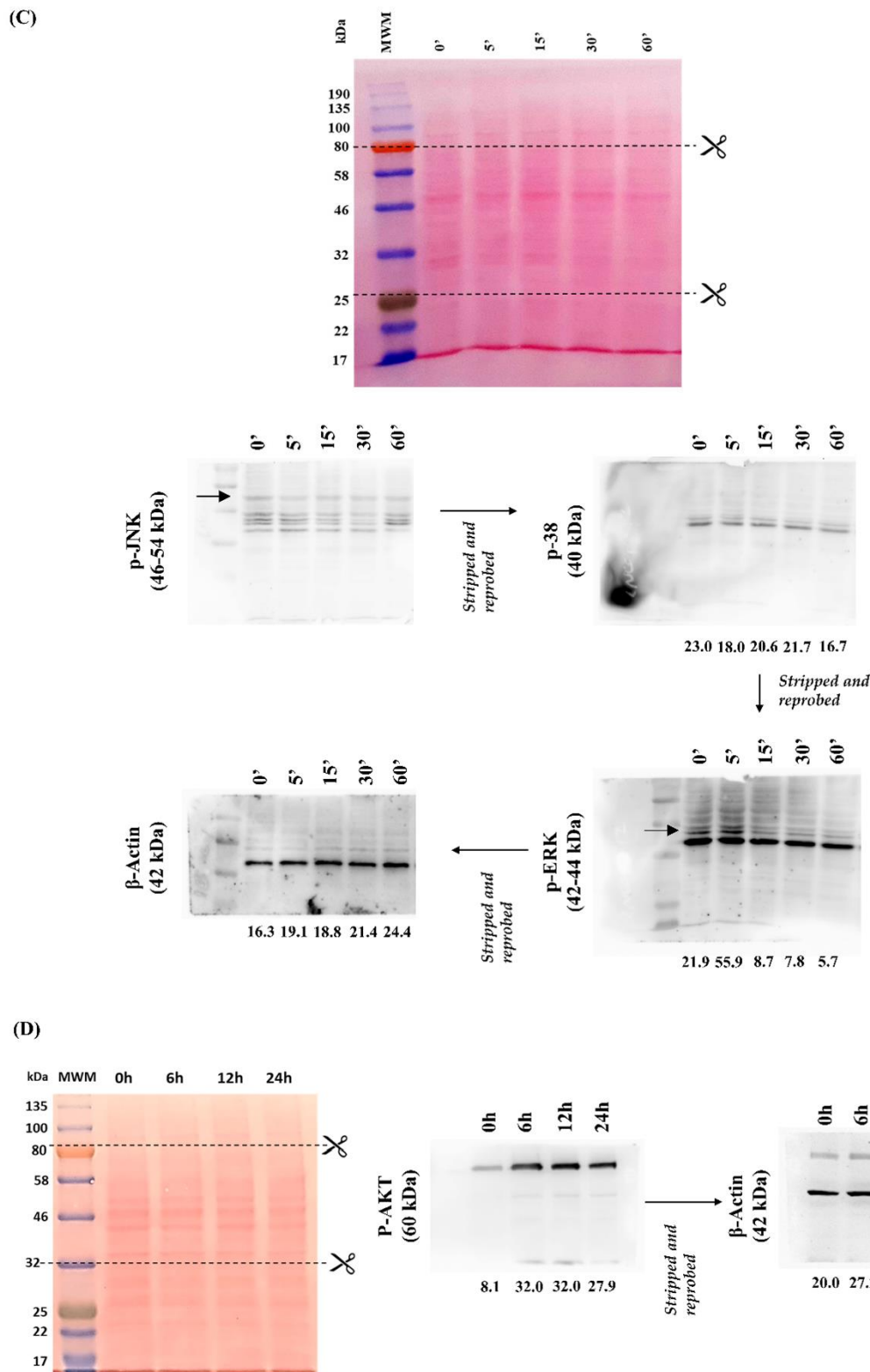


Figure S6. Detail information about Figure 5. The numbers below the membranes represent the percentage of the intensity. Abbreviations: sTWEAK, soluble TNF-like weak inducer of apoptosis; MWM, Molecular Weight Markers; kDa, Kilodaltons; p-JNK, phospho-Jun N-terminal Kinase; p-ERK, phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-p38, phospho- p38 mitogen-activated protein kinase, p-AKT, phospho- Protein kinase B; β-Actin, beta-actin Symbols: Scissor/dotted lines: position where membrane was cut and incubated with antibodies as indicated in each panel.



Detailed information about Figure S2 Complete WB results. The numbers below the membranes represent the percentage of the intensity. Abbreviations: (-)TW, untreated with TNF-like weak inducer of apoptosis; (+)TW, treated with TNF-like weak inducer of apoptosis; MWM, Molecular Weight Markers; kDa, Kilodaltons; FASN, Fatty Acid Synthase; Fn14, Fibroblast growth factor-inducible 14; CPT1A, Carnitine palmitoyltransferase I A; FABP4, Fatty acid-binding protein 4. Symbols: Scissor/dotted lines: position where membrane was cut and incubated with antibodies as indicated in each panel.





Article

Liquid Biopsy-Based Exo-oncomiRNAs Can Predict Prostate Cancer Aggressiveness

Xavier Ruiz-Plazas ^{1,2,†}, Antonio Altuna-Coy ^{1,†}, Marta Alves-Santiago ^{1,2}, José Vila-Barja ^{2,†},
Joan Francesc García-Fontgüvell ^{1,3}, Salomé Martínez-González ³, José Segarra-Tomás ^{1,2,*},
and Matilde R. Chacón ^{1,*}

¹ Disease Biomarkers and Molecular Mechanisms Group, IISPV, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, 43007, Tarragona, Spain; xarupl@gmail.com (X.R.-P.); antonio.altuna@iispv.cat (A.A.-C.); martalves@hotmail.es (M.A.-S.); fontgi@yahoo.es (J.F.G.-F.)

² Urology Unit, Joan XXIII University Hospital, 43007, Tarragona, Spain; jose.vila@urv.cat

³ Pathology Unit, Joan XXIII University Hospital, 43007 Tarragona, Spain; mgonzalez.hj23.ics@gencat.cat

* Correspondence: jsegarra.hj23.ics@gencat.cat (J.S.-T.); mrch2424@gmail.com (M.R.C.);

Tel.: +34-977295500 (ext. 3406)

† These authors contributed equally to this work.

‡ This study is dedicated to the memory of José Vila-Barja, who passed away on 20 February 2020.

§ These authors are joint senior authors on this work.

Simple Summary: The main problem encountered in the management of prostate cancer (PCa) is the inability to distinguish slow-growing indolent tumors from aggressive tumors. It is therefore important to explore non-invasive assays for the early detection of this aggressive subtype, when it can still be treated effectively. The presence of the TWEAK cytokine in biofluids of the PCa microenvironment might drive the secretion of extracellular vesicles (EVs) containing exo-oncomicroRNAs capable of modifying the tumor microenvironment. These exo-oncomicroRNAs are potentially useful as PCa biomarkers. We identified 2 exo-oncomiRNAs isolated from semen EVs by the action of TWEAK in the tumor microenvironment and, we determined their usefulness as biomarkers of PCa prognostic. We also established, for the first time, that TWEAK modulates potential exo-oncomiRNA targets, both tightly linked to cancer progression. In conclusion, our study shows that semen detection of TWEAK-regulated exo-oncomiRNAs can improve PCa prognosis, opening new avenues for diagnosis and treatment.

Abstract: Liquid biopsy-based biomarkers, including microRNAs packaged within extracellular vesicles, are promising tools for patient management. The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is related to PCa progression and is found in the semen of patients with PCa. TWEAK can induce the transfer of exo-oncomiRNAs from tumor cells to body fluids, and this process might have utility in non-invasive PCa prognosis. We investigated TWEAK-regulated exo-microRNAs in semen and in post-digital rectal examination urine from patients with different degrees of PCa aggressiveness. We first identified 14 exo-oncomiRNAs regulated by TWEAK in PCa cells in vitro, and subsequently validated those using liquid biopsies from 97 patients with PCa. Exo-oncomiR-221-3p, -222-3p and -31-5p were significantly higher in the semen of high-risk patients than in low-risk peers, whereas exo-oncomiR-193-3p and -423-5p were significantly lower in paired samples of post-digital rectal examination urine. A panel of semen biomarkers comprising exo-oncomiR-221-3p, -222-3p and TWEAK was designed that could correctly classify 87.5% of patients with aggressive PCa, with 85.7% specificity and 76.9% sensitivity with an area under the curve of 0.857. We additionally found that TWEAK modulated two exo-oncomiR-221-3p targets, *TCF12* and *NLK*. Overall, we show that liquid biopsy detection of TWEAK-regulated exo-oncomiRNAs can improve PCa prognosis prediction.

Keywords: exosomes; Prostate cancer; exo-oncomiRNAs; TWEAK; semen

Citation: Ruiz-Plazas, X.; Altuna-Coy, A.; Alves-Santiago, M.; Vila-Barja, J.; García-Fontgüvell, J.F.; Martínez-González, S.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R. Liquid Biopsy-Based Exo-oncomiRNAs Can Predict Prostate Cancer Aggressiveness. *Cancers* **2021**, *13*, 250. <https://doi.org/10.3390/cancers13020250>

Received: 18 November 2020

Accepted: 7 January 2021

Published: 11 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most commonly diagnosed cancer and the fifth leading cause of cancer-related death in men in the developed world [1]. The incidence and morbidity of PCa continues to increase, likely due to changes in eating habits and the aging of the population [2]. A major challenge in the management of PCa is the inability to distinguish slow-growing and indolent tumors from aggressive tumors, which can lead to under-treatment of patients with aggressive tumors and over-treatment of those with indolent tumors. The prostate-specific antigen (PSA) test together with the tumor-nodes-metastasis (TNM) stage and the Gleason score of prostate biopsy [3] are considered indisputable prognostic factors to guide treatment decision-making. Among them, only PSA is objective, making it the most extensively studied biomarker in PCa [4]. However, its lack of specificity for clinically significant tumors has led to a rise in the number of prostate biopsies performed, with a consequent increase in the diagnosis of insignificant tumors and over-treatment of patients. Accordingly, the establishment of predictive biomarkers that can distinguish between aggressive and indolent PCa would be highly valuable in clinical practice, and could reduce the risk of over-diagnosis/over-treatment. In the context of biomarker discovery, liquid biopsy has proved to be a promising non-invasive modality for cancer diagnosis and prognosis that enables the assessment of circulating molecules in biological fluids, including serum, urine and semen [5].

Inflammation predisposes to the development of cancer and promotes all stages of tumorigenesis [6]. Inflammatory molecules—including cytokines and growth factors—released by immune cells of the inflammatory tumor microenvironment can have a direct effect on pre-malignant and cancer cells by enhancing their proliferation and resistance to cell death and environmental stress, thereby directly promoting tumor growth and progression [6]. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is an inflammatory cytokine that governs tumor growth by promoting inflammation and inducing angiogenesis [7], and is produced by several cells of the immune system (natural killer cells and macrophages, among others) [8]. TWEAK can typically be found as a membrane-anchored (mTWEAK) protein on the surface of cells, but it can also be released as a soluble form (sTWEAK) by proteolytic processing. Both forms function through binding to their bona fide receptor Fn14 [7], forming a receptor–ligand pair. The role of the TWEAK/Fn14 axis has been established in some solid cancers, including breast and brain cancer [7]. We have demonstrated that low serum levels of sTWEAK in head and neck cancer are related to low survival rates, a finding that we later confirmed in a large cohort of patients, overall pointing to sTWEAK as a robust non-invasive biomarker of this disease [9,10]. We have also established a non-invasive biomarker panel with high negative predictive value to classify PCa aggressiveness that included sTWEAK levels and Fn14 mRNA expression [11].

The release of extracellular vesicles (EVs) from cells is an active process and has been shown to be a mechanism of cell-to-cell communication [12]. Exosomes are small (nanometer-size) extracellular cargo vesicles that are secreted after the fusion of endosomes with a plasma membrane, and are released by all cell types including cancer cells [13,14]. Exosomes can induce functional changes to receiving cells in the premetastatic niche—a specialized tumor microenvironment—for instance, aiding PCa cells to overcome the low-androgen conditions in distant metastatic organs [15]. Exosome secretion has long been linked to inflammation [16] and several experimental models have been employed to characterize the role of EVs in the development and progression of inflammatory diseases. The presence of sTWEAK in PCa tumors can not only contribute to fuel tumor progression [17,18], but might also promote the secretion of EVs, which will likely have an impact on the premetastatic niche, favoring the process of migration and proliferation. This is the case for exosomes derived from TWEAK-stimulated macrophages in epithelial ovarian cancer, which have been demonstrated to be internalized by the cancer cells and inhibit cell metastasis [19].

Oncogenic shuttle miRNAs (exo-oncomiRNAs), which show long-term stability in circulation and other body fluids, have been identified in exosomes [20]. Liquid biopsy exo-oncomiRNAs are thus potentially informative diagnostic and/or prognostic biomarkers and might also be helpful in understanding how tumor cells transfer their oncogenic potential to the environment [21]. Several studies have demonstrated that exo-miRNAs isolated from liquid biopsy might be useful for the diagnostic and risk classification of PCa [22,23]. In this context, the most consistently reported deregulated exo-miRNAs identified as promising PCa diagnostic biomarkers in both urine and blood are miR-141, miR-375, miR-21 and Let-7 [24–27]. While miR-141 is also frequently identified to be useful for risk classification in serum [27], other exomiRNAs have been proposed as having prognostic potential such as the combination of miR-1290 and miR-375 in plasma [24] and miR-2909 in urine [28]. The literature is more scarce surrounding semen, and only miRNA-342-3p and miRNA-374b-5p have been proposed as candidates for prognosis, and miRNA-142-3p and miRNA-142-5p were described as having diagnostic potential [29]. Overall, more extensive cohort studies are needed (especially using semen) to validate the identified exomiRNAs.

Exo-oncomiRNAs can be useful tools for non-invasive diagnosis and therapy monitoring in cancer; therefore, in the present study we sought to investigate whether exo-oncomiRNAs are shuttled into biofluids by the action of sTWEAK in the tumor microenvironment, and to determine their usefulness as prognostic PCa biomarkers in two different liquid biopsies: semen and post-digital rectal examination urine. We also aimed to examine the downstream targets of exo-oncomiRNAs, which might be important for the control of PCa.

2. Results

1. Extracellular Vesicle-Derived Exo-oncomiRNAs Are Differentially Expressed in Liquid Biopsies from Patients with Prostate Cancer Based on the Degree of Cancer Aggressiveness

We sought to search for a useful and practicable biomarker panel capable of differentiating aggressive from non-aggressive forms of PCa in liquid biopsy-based exo-oncomiRNAs isolated from EVs and secreted under sTWEAK stimulating conditions. The search was divided into two phases: the initial phase was established to isolate the EV-cargo (exo-oncomiRNAs) secreted into cell culture medium of two PCa cell lines—PC-3 and LNCaP—treated or not with sTWEAK; in the second phase, we assayed for expression using a real-time PCR array of 752 miRNA target onco-miRNAs. We specifically chose an androgen-independent line (PC-3) and an androgen-dependent line (LNCaP). Although the two cell lines do not cover the entire spectrum of PCa, they allowed us to implement a first approach to identify possible exo-miRNAs expressed through the influence of TWEAK [30].

Isolated EVs were confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and by Western blot analysis of selected EV markers in order to comply with the guidelines of the International Society of Extracellular Vesicles [31]. Results confirmed the presence of EVs within the expected range (30–100 nm), which were enriched for CD9, CD63 and CD81 markers (Figure 1). The detailed results of immunoblotting are shown in Figure S1.

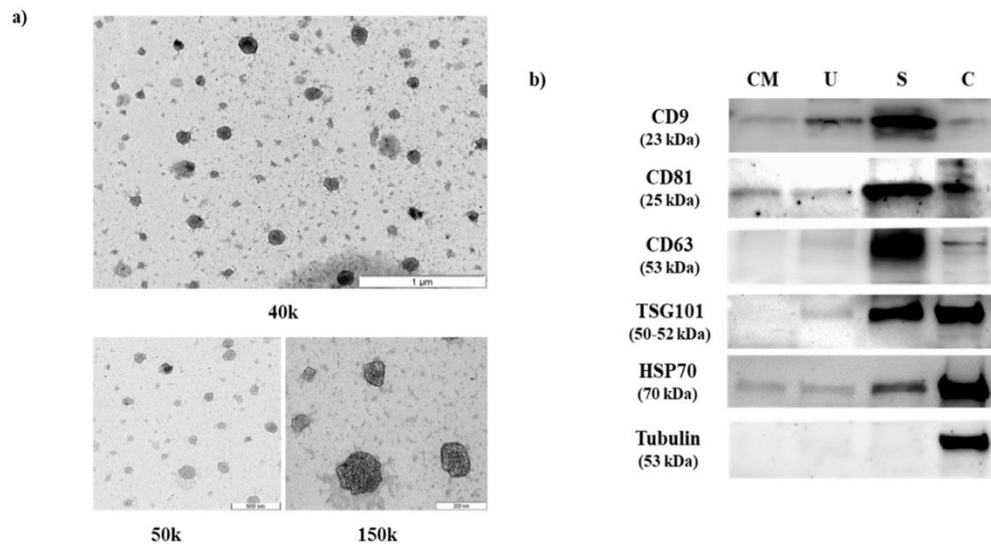


Figure 1. Characterization of isolated extracellular vesicles. (a) Analysis of extracellular vesicles (EVs) by electron microscopy at different magnification. (b) Western blot image of protein extracts prepared from EVs isolated from PC-3 culture media (CM), post-digital rectal examination urine (U), semen (S) and total cell extract from PC-3 (C), and tested with the following antibodies: CD9, CD81, CD63, TSG101, HSP70 and tubulin. Uncropped Western Blot image is available in Figure S1.

By screening a 752-miRNA panel, the following 14 exo-oncomiRNAs were selected from the first phase study that were significantly altered after sTWEAK treatment, comparing either PC-3 or/and LNCaP cell lines, which accomplished the following criteria: cycle threshold (Ct) < 33 and at least >1.8-fold-over-expression when comparing both sTWEAK-stimulated cell lines (Table S1): miR-125b-1-3p, miR-193b-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-23a-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-31-5p, miR-497-5p, miR-643, miR-663b, miR-940, miR-9-5p and miR-99a-3p.

In the second phase of the experimental approach, we evaluated the expression levels of the 14 selected exo-oncomiRNAs in EVs isolated from liquid biopsy (semen and post-digital rectal examination urine) from 97 patients with low- or high-risk PCa. Pathological and clinical characteristics of patients are listed in Table 1. Gleason grade (GG) criteria and TNM classification was determined in accordance with the International Society of Urological Pathology (ISUP). Complementary examinations included prostate volume, measured by transrectal ultrasound, and PSA, as in standard clinical practice.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of the studied cohort.

Patient's Characteristics	Mean ± SD	N
Age (years)	63.5 ± 6.35	97
Prostatic Volume (c.c)	47.49 ± 23.09	97
Testosterone (nmol/L)	14.37 ± 5.07	97
Total PSA (ng/mL)	9.57 ± 7.92	97
		N (%)
BMI (kg/m ²)	<25	25 (25.8)
	25 ≤ x ≤ 29.99	50 (51.5)
	≥30	19 (19.6)
Total PSA (ng/mL)	<4	8 (8.2)
	4 ≤ x < 10	60 (61.9)

	≥ 10	29 (29.9)
ISUP-GG		
Low Risk	Group I	32 (33.0)
	Group II	25 (25.8)
High Risk	Group III	23 (23.7)
	Group IV	10 (10.3)
	Group V	7 (7.2)
T pathological stage		
	≤T2a	68 (70.1)
	T3,T4	29 (29.9)
N pathological stage		
	NX	57 (58.8)
	N0	34 (35.1)
	N1	6 (6.2)

Abbreviations: BMI, body mass index; ISUP-GG, International Society of Urological Pathology Gleason Grade groups based on the Gleason score as follows: (Gleason score ≤ 6—group I; 3 + 4 = 7 group II; 4 + 3 = 7 group III; 4 + 4 = 8—group IV; and 9–10—group V); PSA, prostate-specific antigen; T stage, Tumor category; N node, category. The bolded words differentiate the clinical and pathological characteristics from the rest of the table.

Analysis of the expression pattern of the 14 selected exo-oncomiRNAs in liquid biopsy of semen and post-digital rectal examination urine from patients with high-risk (ISUP Group III, IV and V) and low-risk (ISUP Group I and II) PCa revealed significant differences in the following five exo-oncomiRNAs: exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR-222-3p, exo-oncomiR-31-5p, which were up-regulated in semen of high-risk patients versus low-risk patients; and exo-oncomiR-193-3p and exo-oncomiR-423-5p, which were down-regulated in post-digital rectal examination urine samples of high-risk patients (Figure 2). There were no significant differences between the studied groups for the remaining nine exo-oncomiRNAs (Table S2).

We also examined for clinical and metabolic differences between the high-risk and low-risk groups (Table 2). Univariate analysis showed that only total PSA was significantly higher in the high-risk group than in the low-risk group ($p = 0.007$), whereas sTWEAK semen levels were significantly lower in the high-risk group than in the low-risk group ($p = 0.009$) (Table 2), as has been reported [11]. We then tested for correlations between the five differentially expressed exo-oncomiRNAs and clinical and metabolic parameters using Spearman's bivariate correlation coefficient test. The most relevant associations observed were the significant negative correlations between semen sTWEAK levels and the expression levels of exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR-222-3p, and exo-oncomiR31-5p ($r = -0.375$ $p = 0.017$, $r = -0.387$ $p = 0.013$ and $r = -0.364$ $p = 0.021$, respectively) (Figure S2).

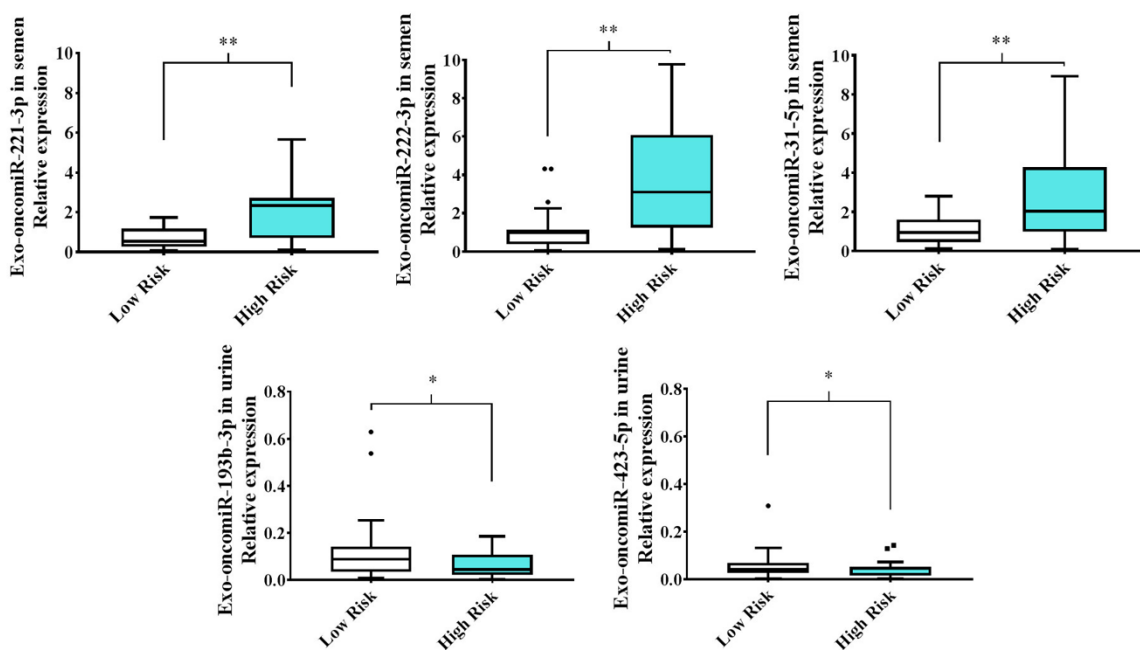


Figure 2. Exo-oncomiRNAs are differentially expressed in liquid biopsy from patients with prostate cancer. Box plots of relative expression of the 5 discriminatory exo-oncomiRNAs analyzed in semen and post-digital rectal examination urine liquid biopsies from patients with low- and high-risk PCa. Results are expressed as mean values \pm SD. Statistical differences between groups are indicated: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Table 2. Anthropometric and analytical characteristics according to ISUP-GG criteria.

Patient's Stratification	ISUP GG Classification		<i>p</i> -Value
	Low-Risk	High-Risk	
	(Group I and II)	(Group III, IV and V)	
	N = 57	N = 40	
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Anthropometric parameters			
Age (years)	62.46 \pm 6.74	64.96 \pm 5.52	0.066
BMI (kg/m ²)	27.97 \pm 4.07	27.64 \pm 3.46	0.718
Prostatic volume (c.c)	48.68 \pm 24.56	45.81 \pm 21	0.687
Glycemic profile			
Glucose (mmol/L)	5.82 \pm 1.1	6.29 \pm 2.26	0.388
Insulin (pmol/L)	89.36 \pm 58.39	87.42 \pm 47.09	0.841
HOMA-IR	3.46 \pm 2.58	3.67 \pm 2.71	0.841
HbA1c (%)	5.74 \pm 0.64	5.92 \pm 0.84	0.364
Lipid profile			
Cholesterol (mmol/L)	5.03 \pm 1.06	5.03 \pm 1.1	0.957
HDL cholesterol (mmol/L)	1.49 \pm 0.73	1.42 \pm 0.39	0.672
LDL cholesterol (mmol/L)	3.28 \pm 1.3	3 \pm 0.88	0.503
Triglycerides (mmol/L)	1.36 \pm 0.74	1.55 \pm 0.96	0.711
Hepatic profile			
AST (μ kat/L)	0.39 \pm 0.19	0.33 \pm 0.07	0.171
ALT (μ kat/L)	0.42 \pm 0.22	0.36 \pm 0.11	0.402

GGT (μ kat/L)	0.7 \pm 0.85	0.65 \pm 0.48	0.887
Renal profile			
Uric acid (μ mol/L)	368.05 \pm 83.1	456.2 \pm 529.55	0.376
Urea (mmol/L)	14.26 \pm 3.23	14.8 \pm 5.12	0.808
Creatinine (μ mol/L)	85.83 \pm 18.44	80.05 \pm 13.97	0.072
Hormonal profile			
SHBG (nmol/L)	46.13 \pm 52.46	40.02 \pm 16.36	0.814
Testosterone (nmol/L)	14.93 \pm 4.62	13.55 \pm 5.63	0.101
Tumoral marker			
Total PSA (μ g/L)	7.71 \pm 4.8	12.24 \pm 10.43	0.007
Biofluid Biomarker profile			
Semen cytokines (pg/mg of total protein)			
sTWEAK	989.62 \pm 685.75	617.25 \pm 447.57	0.009
Exo-oncomiRNAs in semen—Relative expression levels			
miR-221-3p	0.75 \pm 0.6	2.17 \pm 1.7	0.002
miR-222-3p	2.01 \pm 2.79	3.79 \pm 2.92	0.006
miR-31-5p	1.05 \pm 0.73	2.75 \pm 2.27	0.004
Exo-oncomiRNAs in urine—Relative expression levels			
miR-193-3p	0.12 \pm 0.12	0.06 \pm 0.05	0.037
miR-423-5p	0.05 \pm 0.05	0.04 \pm 0.03	0.034

BMI, body mass index; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; HbA1c, Hemoglobin A1c; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, γ -Glutamyltransferase; SHBG, sex hormone-binding globulin; PSA, prostate-specific antigen; sTWEAK, soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis.

2.2. Semen Levels of Exo-oncomiR-221-3p May Help Identify an Aggressive Prostate Cancer Phenotype

We developed a partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) model to evaluate the potential of the five selected exo-oncomiRNAs plus PSA in serum, sTWEAK in semen, age, prostatic volume, and testosterone, for the stratification of patients. Cross-validation analyses showed that a one-component model had an accuracy of 72.02% ($R^2 = 0.2073$ and $Q^2 = 0.1493$) (Figure S3a) indicating that is a good predictive model [32]. With regards to the importance of individual components, variable importance in projection (VIP) scores highlighted age, exo-oncomiR-222-3p in semen, exo-oncomiR-31-5p in semen, PSA in serum, sTWEAK in semen and exo-oncomiR-221-3p in semen as the most important variables (Figure 3). The VIP model estimated that exo-oncomiR-221-3p in semen and sTWEAK in semen had more influence than total PSA (Figure 3).

Variables with VIP score ≥ 1 were considered important in the model for determining PCa aggressiveness. To evaluate the usefulness of exo-oncomiRNAs as potential prognosis biomarkers of PCa aggressiveness in liquid biopsy, we performed logistic regression and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis combining the following variables: exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR-222-3p, exo-oncomiR-31-5p, total PSA, sTWEAK levels and age; Table 3 lists the different combinations. Results showed that the area under the curve (AUC) of each individual variable was below 0.8. Thus, we used a multivariate regression model combining each potential biomarker to test which combination was more suitable for correct diagnosis. Notably, we observed that the presence of exo-oncomiR-221-3p outperformed the other individual variables alone or in

combination. The best panel in our study to distinguish PCa aggressiveness was that composed by exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR-222-3p and semen sTWEAK, which could correctly classify 87.5% of patients, with an AUC of 0.857 and with 85.7% specificity and 76.9% sensitivity (Table 3) (Figure S3).

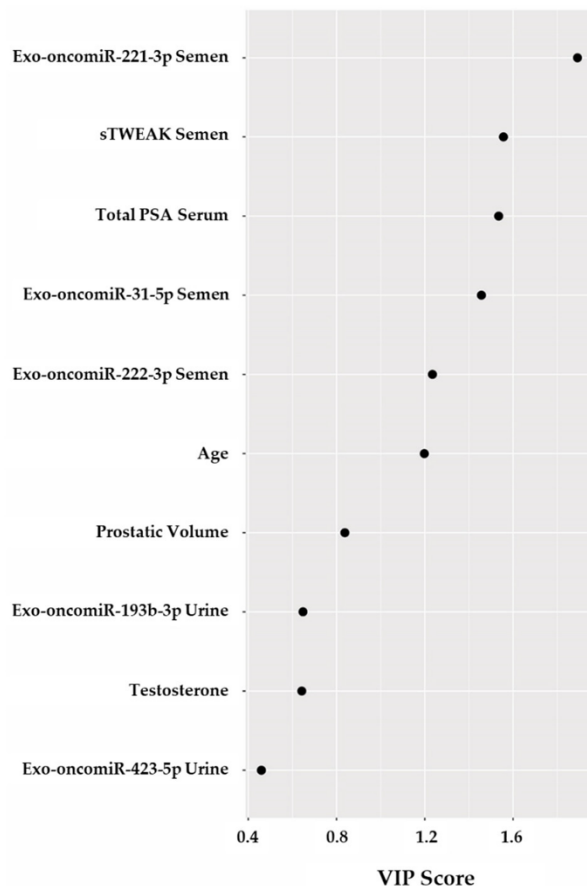


Figure 3. Variable importance in projection (VIP) scores. Selected variables: total PSA, testosterone, prostatic volume, age, sTWEAK in semen, exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR222-3p, exo-oncomiR31-5p, exo-oncomiR-193-3p and exo-oncomiR-423-5p are shown in the model. Variables with scores close to or greater than 1 were considered important in the model.

Table 3. Exo-oncomiRNAs-based models as diagnostic classifiers.

ROC Model	95% CI						Sensitivity (%)	Specificity (%)	% Correct Diagnosis
	AUC	Error	p-Value	Lower	Upper				
Age	0.610	0.058	0.066	0.496	0.724	85	75.4	62.9	
Total PSA	0.662	0.056	0.007	0.552	0.772	85	31.6	63.9	
sTWEAK	0.708	0.072	0.009	0.567	0.848	85.7	52.8	71.9	
exo-oncomiR-221-3p	0.79	0.078	0.002	0.638	0.943	86.7	55.6	78.6	
exo-oncomiR-222-3p	0.758	0.08	0.006	0.601	0.915	86.7	74.1	66.7	
exo-oncomiR-31-5p	0.768	0.082	0.004	0.607	0.929	86.7	48.1	76.2	
Total PSA + Age	0.704	0.054	0.001	0.597	0.810	85	70.2	67	
Total PSA + sTWEAK	0.738	0.072	0.003	0.597	0.879	85.7	47.2	71.9	
Total PSA + exo-oncomiR-221-3p	0.864	0.063	<0.001	0.74	0.998	86.7	55.6	83.3	
Total PSA + exo-oncomiR-222-3p	0.78	0.071	0.003	0.641	0.919	86.7	55.6	73.8	
Total PSA + exo-oncomiR-31-5p	0.832	0.07	<0.001	0.695	0.969	86.7	51.9	81	
sTWEAK + Age	0.709	0.069	0.009	0.574	0.844	85.7	50	66.7	
sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p	0.841	0.073	<0.001	0.698	0.983	85.7	69.2	82.5	
sTWEAK + exo-oncomiR-222-3p	0.745	0.086	0.012	0.576	0.913	85.7	42.3	70	
sTWEAK + exo-oncomiR-31-5p	0.808	0.077	0.001	0.657	0.958	85.7	61.5	77.5	
exo-oncomiR-221-3p + Age	0.802	0.077	0.001	0.651	0.954	86.7	33.3	76.2	
exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p	0.802	0.078	0.001	0.65	0.955	86.7	63	76.2	

exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.8	0.079	0.001	0.646	0.954	86.7	55.6	81
exo-oncomiR-222-3p + Age	0.751	0.081	0.008	0.592	0.909	86.7	66.7	73.8
exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.8	0.077	0.001	0.649	0.951	86.7	55.6	81
exo-oncomiR-31-5p + Age	0.778	0.078	0.003	0.625	0.930	86.7	44.4	73.8
Total PSA + sTWEAK + Age	0.746	0.067	0.002	0.614	0.878	85.7	44.4	73.7
Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p	0.863	0.068	<0.001	0.73	0.996	85.7	69.2	85
Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-222-3p	0.758	0.086	0.008	0.59	0.926	85.7	46.2	75
Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-31-5p	0.824	0.076	0.001	0.675	0.974	85.7	73.1	77.5
Total PSA + exo-oncomiR-221-3p + Age	0.889	0.056	<0.001	0.780	0.998	85.7	37	83.3
Total PSA + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p	0.872	0.06	<0.001	0.755	0.988	86.7	59.3	83.3
Total PSA + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.854	0.067	<0.001	0.724	0.985	86.7	51.9	83.3
Total PSA + exo-oncomiR-222-3p + Age	0.840	0.064	<0.001	0.714	0.965	86.7	37	83.3
Total PSA + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.849	0.069	<0.001	0.713	0.985	86.7	59.3	83.3
Total PSA + exo-oncomiR-31-5p + Age	0.862	0.061	<0.001	0.743	0.981	86.7	37	83.3
sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + Age	0.854	0.067	<0.001	0.723	0.986	85.7	23.7	77.5
sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p	0.857	0.069	<0.001	0.721	0.993	85.7	76.9	87.5
sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.841	0.073	<0.001	0.698	0.983	85.7	69.2	82.5
sTWEAK + exo-oncomiR-222-3p + Age	0.764	0.078	0.006	0.611	0.917	85.7	50	72.5
sTWEAK + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.83	0.073	0.001	0.687	0.972	85.7	53.8	82.5
sTWEAK + exo-oncomiR-31-5p + Age	0.821	0.074	0.001	0.677	0.966	85.7	34.6	75
exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.807	0.076	0.001	0.658	0.956	86.7	51.9	83.3
exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + Age	0.820	0.074	0.001	0.675	0.965	86.7	25.9	76.2
exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-31-5p + Age	0.812	0.074	0.001	0.668	0.957	86.7	37	78.6
exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p + Age	0.802	0.075	0.001	0.655	0.950	86.7	44	78.6
Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p	0.86	0.071	<0.001	0.721	0.999	85.7	69.2	85
Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.86	0.069	<0.001	0.724	0.995	85.7	69.2	85
Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.83	0.076	0.001	0.682	0.978	85.7	65.4	82.5
Age + Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p	0.879	0.62	<0.001	0.757	1	85.7	23.1	85
Age + Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-222-3p	0.808	0.074	0.001	0.662	0.953	85.7	50	82.5
Age + Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-31-5p	0.849	0.069	<0.001	0.715	0.983	85.7	53.2	82.5
Age + Total PSA + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p	0.894	0.053	<0.001	0.789	0.998	86.7	56.7	83.3
Age + Total PSA + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.879	0.059	<0.001	0.764	0.994	86.7	54.3	83.3
Age + Total PSA + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.867	0.059	<0.001	0.752	0.982	86.7	49.2	81
Age + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p	0.868	0.061	<0.001	0.748	0.988	86.7	46.5	80
Age + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.857	0.067	<0.001	0.726	0.988	85.7	76.9	80
Age + sTWEAK + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.832	0.070	0.001	0.695	0.969	86.7	46.5	80
Age + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.820	0.072	0.001	0.678	0.962	86.7	48.1	81
Total PSA + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.874	0.061	<0.001	0.754	0.995	86.7	55.6	83.3
sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.86	0.068	<0.001	0.726	0.994	85.7	73.1	85
Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.865	0.069	<0.001	0.73	1	85.7	69.2	85

Age + Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p	0.879	0.062	<0.001	0.757	1	86.7	70.4	87.5
Age + Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.879	0.062	<0.001	0.758	1	86.7	57.9	85
Age + Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.857	0.065	<0.001	0.729	0.985	85.7	58.3	85
Age + Total PSA + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.896	0.053	<0.001	0.793	0.999	86.7	57.9	83.3
Age + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.874	0.061	<0.001	0.755	0.992	85.7	63.8	82.5
Age + Total PSA + sTWEAK + exo-oncomiR-221-3p + exo-oncomiR-222-3p + exo-oncomiR-31-5p	0.879	0.062	<0.001	0.757	1	85.7	68.9	87.5

Receiver operating characteristic (ROC) curve values showing the predictive efficiency for distinguishing PCa aggressiveness. Percentage of correct diagnostic values was obtained by multivariate models (backward stepwise, conditional method). AUC, area under the curve; 95% CI (confidence interval). The bolded words represent the ROC Models.

2.3. TWEAK Modulates Potential Predicted Targets for oncomiR-221-3p

Several studies have shown that oncomiR-221 and oncomiR-222 are dysregulated in many cancers [33], including PCa [34,35], which is in line with our findings showing down-regulated exo-oncomiR-221-3p and exo-oncomiR-222-3p in semen liquid biopsy of PCa. In vitro analysis showed that oncomiR-221-3p expression was found significantly up-regulated by sTWEAK only in PC-3 cells, both internally and in secreted EVs, and not in LNCaP cells, indicating that sTWEAK can potentially modulate oncomiR221-3p downstream targets (Figure 4a).

To demonstrate a direct effect of sTWEAK on oncomiR-221-3p targets, we first searched for possible oncomiR-221-3p targets and selected only those shared by the miRanda, Diana-MicroT-CDS and miRWalk databases. We obtained 69 genes with putative target sites for oncomiR-221-3p in their 3' untranslated regions. We then ranked the candidate genes by the miRSVR score (the lower the score, the stronger the match to the seed region); if two or more targets had a similar miRSVR score we considered the higher score from the Diana-microT-CDS algorithm, miTG. With these criteria, we selected 10 possible targets implicated in cancer and/or inflammation (Figure 4b, Table S3), shared also by onco-miR222-3p, because both miRNAs are encoded in tandem and contain identical seed sequences separated by 727 bases [33] (Table S4). Of the 10 targets only NLK (Nemo-like kinase) and TCF12 (transcription factor 12) expression levels were found to be reduced in PC-3 cells after sTWEAK treatment for 24 h by real-time PCR (Figure 4c) and Western blotting (Figure 4d). The stimulatory effect of sTWEAK was accompanied by the increased expression of its receptor Fn14 (Figure 4d).

Finally, we performed in vitro experiments using PC-3 cells and an oncomiR-221-3p inhibitor, which consistently influenced the expression of its target genes as demonstrated by the reduced expression of TCF12 and NLK proteins when compared with non-treated counterparts (Figure 4d). As anticipated, combined sTWEAK stimulation and oncomiR-221-3p inhibition resulted in a significant down-regulation of NLK and TCF12 protein levels (Figure 4d). The detailed results of immunoblotting are shown in Figure S4.

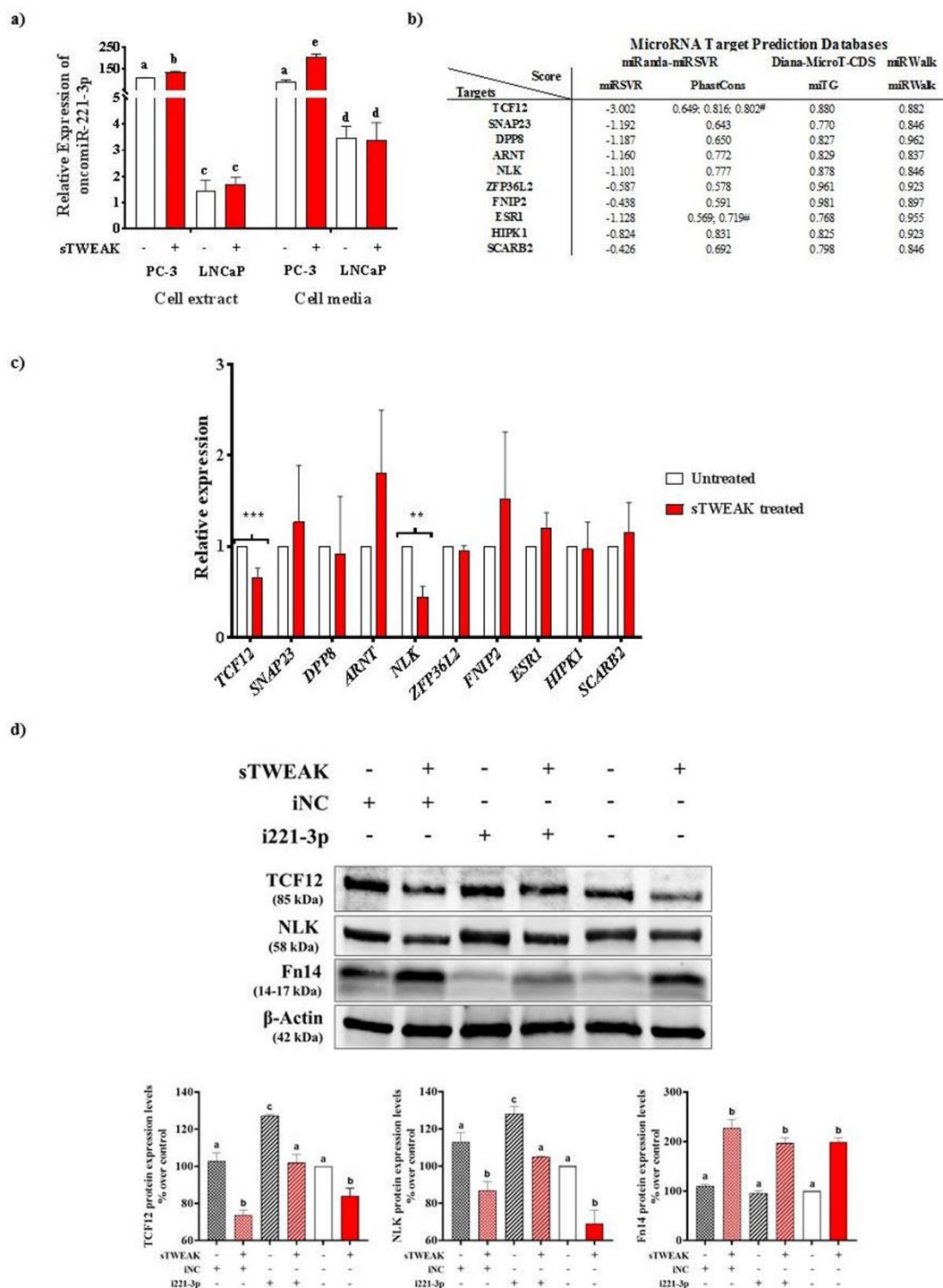


Figure 4. sTWEAK regulates oncomiR-221-3p expression and down-regulates NLK and TCF12 targets. (a) on- comiR-221-3p expression in PC-3 and LNCaP cell extracts and in extracellular vesicles (EVs) isolated from cell media. Different lettering over boxes indicates statistical differences. Significant differences are established at $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 4$ experiments). (b) Selected targets for oncomiR-221-3p by 3 different target prediction algorithms. # conserved elements in multiply-aligned sequences. (c) qRT-PCR mRNA expression of selected on- comiR-221-3p targets in PC-3 cells before and after treatment with sTWEAK. Significant differences: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$ experiments). Transcription factor 12 (TCF12); synaptosome associated protein 23 (SNAP23); dipeptidyl peptidase 8 (DPP8); aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT); Nemo-like kinase (NLK); ZFP36 ring finger protein-like 2 (ZFP36L2); folliculin interacting protein 2 (FNIP2); estrogen receptor 1 (ESR1); homeodomain interacting protein kinase 1 (HIPK1); and scavenger receptor class B-ember 2 (SCARB2). (d) Expression of TCF12, NLK and Fn14 protein in PC-3 cells transfected with the oncomiR-221-3p inhibitor and further treated with sTWEAK. Representative Western blots are presented (top). The membranes were tested with the corresponding

antibody. iNC: inhibitor negative control, i221-3p: inhibitor miR-221-3p; Nemo-like kinase (NLK); transcription factor 12 (TCF12); fibroblast growth factor 14 (Fn14). Relative protein expression levels are shown (bottom), which were normalized to the corresponding control β -actin. Different lettering over boxes indicates statistical differences. Significant differences are established at $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 3$ experiments). Full-length blots and gels are presented in Figure S4.

3. Discussion

Histopathological biopsy analysis is a common method for the diagnosis of PCa. This procedure, however, only enables the analysis of part of the prostatic gland and, because of the typical multifocal nature of PCa, information from a single biopsy is often insufficient and does not reflect the dynamics of the tumor in the prostate.

Diagnosis of cancer through the use of liquid biopsy has proven to be particularly useful as a non-invasive method of diagnosis and disease progression monitoring [36]. In a similar line, exosomal miRNAs isolated in the context of cancer, termed exo-oncomiRNAs, are promising biomarkers in part due to their stability in body fluids and ease of detection and quantification at low cost. Additionally, exo-oncomiRNAs have a very important role in modulating several critical cancer processes, including proliferation, migration, and angiogenesis, through their regulation of important target genes within the tumor environment [37].

Some exo-oncomiRNAs (e.g., miR-375, miR-21 and miR-141 [24,38]) from biofluids including blood and urine are known to have diagnostic and prognostic capacity in PCa. However, inconsistencies in identified, dysregulated exo-oncomiRNA profiles have been reported, likely due to a lack of standardized exosomal isolation and miRNA quantification techniques [23]. Despite these challenges, exo-oncomiRNAs remain highly promising biomarker candidates to aid in PCa diagnosis and prognosis.

We previously established a non-invasive biomarker panel with high negative predictive value to classify PCa aggressiveness. Specifically, this biofluid signature comprised the following biomarkers: total PSA serum levels, semen levels of sTWEAK, fasting serum glycemia, and mRNA expression levels of *Fn14*, *KLK2* (a gene that encodes a protease that activates pre-PSA) and two chemokine receptors (*CXCR2* and *CCR3*) in semen cell sediment. This panel can identify PCa aggressiveness with 90.9% success [11]. Although this panel could aid the clinical prognosis of PCa by outperforming the classical clinical biomarkers (age, T-classification, and total PSA serum levels), it requires the measurement of seven different biomarkers and uses two different biological samples—serum and semen.

In the aforementioned study, we observed that in patients with high-risk PCa, the decrease in sTWEAK levels in semen was accompanied by an increase in *Fn14* mRNA levels in seminal cell sediment, pointing to an active process of ligand–receptor interaction that may favor cell proliferation and migration, as described in PCa cell models [17,18]. Accordingly, the presence of TWEAK in PCa tumors could not only fuel tumor progression, but might also promote the secretion of exo-oncomiRNAs contained within EVs, which will likely have an impact on the tumor microenvironment.

In the search for an improved prognostic panel for PCa focusing on TWEAK-induced exo-oncomiRNAs, we show here that five exo-oncomiRNAs (exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR-222-3p, exo-oncomiR-31-5p, exo-oncomiR-193b-3p, exo-oncomiR-423-5p) are significantly dysregulated between low- and high-risk PCa. VIP analysis of selected variables (including age, exo-oncomiRNA levels in semen and urine and, several analytical parameters) showed that variables with VIP scores greater than 1, considered of importance in the model for determining PCa aggressiveness, included only the three exo-oncomiRNAs expressed in semen (exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR-222-3p and exo-oncomiR-31-5p). This finding may not be causal. Because 25% of semen is derived from prostatic tissue [39], its contents are more likely to contain prostate disease-specific exo-oncomiRNAs [29] than post-digital rectal examination urine samples [40].

After testing several logistic regression models followed by ROC analysis including the 3 selected biomarkers (exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR-222-3p and sTWEAK), the measurements in semen liquid biopsy had the best prognostic accuracy (AUC = 0.857, $p = 0.001$) when compared with the ROC curve analysis using only serum PSA levels (AUC = 0.662, $p < 0.007$). This new model can outperform the classical PSA biomarker by 23.6% for a correct diagnosis, improving the classification efficacy up to 87.5%. If we include the two selected exo-oncomiRNAs (exo-oncomiR-221-3p, exo-oncomiR-222-3p) plus PSA levels in serum, the model can predict PCa severity better than is commonly reported by PSA screening alone; however, the model composed of sTWEAK, exo-oncomiR-221-3p and exo-oncomiR-222-3p—all measured in semen—improves not only the percentage of positively diagnosed patients by 2.25%, but increases the specificity by 8%.

MiR-221 and miR-222 are encoded tandemly in chromosome Xp11.3, and are highly homologous miRNAs sharing the same “seed sequences” [33,41]. In vivo studies have demonstrated that miR-221/222 down-regulation impairs the growth of PCa xenografts, pointing to miR-221-3p as an oncogenic miRNA in PCa [42]. In the present study, we observed that the addition of exo-oncomiR-221-3p expression levels in semen improves all prognostic model panel combinations. miR-221 is overexpressed in a variety of epithelial cancers including breast, liver, bladder, pancreas, gastric, colorectal cancer, melanoma, papillary thyroid carcinoma and glioblastoma [33]. Additionally, miR-221 has been found to be related to cancer progression in cervical squamous cell carcinoma [43], confers adriamycin resistance in breast cancer [44], and is a biomarker in hepatocellular carcinoma [45], diffuse large B cell lymphomas [46] and lung adenocarcinoma [47].

Studies on the expression of miR-221 in PCa (which is referred to as mir-221-3p in MirBase), have used only PCa tissue [48,49] and have found the levels to be up-regulated. Here we show, for the first time to our knowledge that the expression levels of miR-221-3p in PCa biofluids are higher in high-risk patients than in low-risk peers, and we additionally show that miR-221-3p is up-regulated in PC-3 secreted EVs and cell extracts. Mechanistically, in vitro studies have determined that miR-221-3p promotes proliferation of PCa cells [50].

MiR-221 directly targets NLK in neuroblastoma cells [51]. Accumulating evidence demonstrates that NLK has a pivotal role in cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis by regulating a variety of transcriptional molecules [52]. NLK expression in PCa metastases is decreased in comparison with normal prostate epithelium and primary PCa [53]. Our findings show that oncomiR-221-3p inhibits NLK protein expression in PC-3 cells and that expression is further reduced by sTWEAK. An additional predicted and experimentally-demonstrated target for miR-221-3p is TCF12, a transcription factor member of the helix–loop–helix protein family found to be extensively expressed in many tissues [54]. As a target of miR-221, TCF12 has been related to survival after diagnosis of colon cancer [55], and there is evidence to suggest that TCF12 is involved in cell migration and differentiation [56]. Interestingly, the status of TCF12 has been found to be an independent predictor of biochemical recurrence-free survival in PCa [57]. We show here that miR-221-3p likely regulates TCF12 in PC-3 cells and its expression is, in turn, regulated by sTWEAK. While our findings point to the possibility that regulation of NLK or TCF12 might be a therapeutic approach against PCa tumors, further research and validation either in preclinical models or other established PCa cell lines will be needed to test their functional relevance in cell proliferation, invasion and chemosensitivity to cytotoxic agents.

Overall, our results reveal that TWEAK inflammation-induced exo-oncomiRNAs are components of an improved PCa prognostic panel based only on information obtained from a unique liquid biopsy, semen. Additionally, we reveal that a TWEAK inflammatory challenge in PCa cells can potentiate oncomiR-221-3p action.

4. Materials and Methods

1. Cell Culture

The PC-3 and LNCaP cell lines were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). PC-3 cells were cultured in Ham's F-12K (Kaighn's) medium (1:1 mixture) with L-glutamate (Gibco, Fisher Scientific SL, Madrid, Spain), and LNCaP cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1 mM sodium pyruvate (Gibco). Cultures were also supplemented with 10% fetal bovine serum, 1× antibiotic-antimycotic solution (Gibco), and 5 µg/mL plasmocin, and cultured in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were grown in exosome-deprived serum overnight before stimulation for 24 h with 100 ng/mL human recombinant (hr) TWEAK (PeproTech, BioNova Cientifica, Barcelona, Spain).

2. Extracellular Vesicle Isolation from Cell Culture Media and Exo-oncomiRNA Expression Profile Using TaqMan Low-Density Arrays

Exosomes and other extracellular vesicles from cell culture media (PC-3 and LNCaP) were isolated and exo-oncomiRNAs were extracted using the exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit (Qiagen, BioNova Cientifica, Madrid, Spain). For exo-oncomiRNA screening, the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA Synthesis Kit (Exiqon, BioNova Cientifica, s.l. Madrid, Spain) was used for reverse transcription. cDNA was diluted and assayed by qRT-PCR according to the protocol in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Each exo-oncomiRNA was assayed using ExiLENT SYBR Green Master Mix on the Human panel I+II, V5, miRCURY LNA miRNA miRNome PCR Panel (Qiagen) that included 752 mature human cancer-related miRNAs. Fluorescence readings and expression records of the microRNAs during the qRT-PCR were performed with the SDS 2.3 program (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). From the quantitative analysis by qRT-PCR of all miRNAs analyzed, we only considered those miRNAs that showed expression levels with a $C_t < 33$. Then, using the GeneGlobe program (Qiagen) [58], C_T values for each sample were normalized to the arithmetic mean of the following reference miRNAs, hsa-miR-423-5p, SNORD38B, SNORD49A, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-103a-3p and U6 small nuclear RNA. The fold change expression of each exo-oncomiRNA was calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ where each miRNA, regardless of the condition, was first normalized to the C_T of an endogenous control and then we calculated the $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ sample treated sTWEAK} - \Delta C_t \text{ untreated controls}$. The exo-oncomiRNAs with $p \leq 0.05$ when comparing cell type and condition and with an increase ≥ 1.8 -fold were considered for further analysis.

3. Extracellular Vesicle Analysis

Extracellular vesicles from culture media, post-digital rectal examination urine and semen were obtained using exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit just before miRNA isolation by the addition of 500 µL of elution buffer XE. The isolated EVs were further concentrated using a 100,000 Da cut-off concentrator (Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters, Millipore). Samples were then ultrasonicated 3 times during 1 min bouts. Total protein was quantified using the BCA method (Pierce). A total amount of 10 µg EV protein and 10 µg total PC-3 cell extract were loaded on 4–15% SDS-PAGE gels and immunoblotted with polyclonal rabbit antibodies against: EXOAB-CD9A1, EXOAB-CD81A-1, EXOAB-CD63A-1, EXOABHsp70A-1, EXOAB-TSG101-1 (System Biology, Palo Alto, CA, USA), and the mouse monoclonal antibody for tubulin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). HRP-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (both from SBI) were used as secondary antibodies. All Western blots were developed with SuperSignal West Femto chemiluminescence substrate (Pierce Biotechnology, Boston, MA, USA) and visualized with the VersaDoc imaging system and Quantity One software (Bio-Rad, Barcelona, Spain) (Supplementary Materials).

4. Transmission Electron Microscopy Analysis

EVs were placed on carbon-coated copper grids (200 mesh), allowed to dry, and incubated in osmium tetroxide vapors for 15–30 min. TEM images were collected using a JEOL 1011 transmission electron microscope operating at 80 kV with a megaview III camera.

5. Patients

Our studied patient cohort comprised 97 consecutive patients with PCa who had undergone radical prostatectomy by open surgery at the University Hospital Joan XXIII, Tarragona, between 2015 and 2019—laparoscopic or robotic surgery (intra-peritoneal or extra-peritoneal—with or without bilateral ilio-obturator lymphadenectomy, according to the estimated risk of lymphadenopathy based on the Briganti nomogram [56]. Patients were stratified according to the 2014 ISUP-GG and TNM classification [57,58]. Patients were stratified into two categories: low-risk (ISUP Group I and II) and high-risk (ISUP Groups III, IV and V). Written informed consent prior to their inclusion was provided by all patients. The study was approved by our local ethics committee and performed according to the provisions of the Declaration of Helsinki (Biomedical Research Law 14/2007, Royal Decree of Biobanks 1716/2011, Organic Law 15/1999 of September 13 Protection of Personal Data) [11]. Clinical parameters, tumor aggressiveness, and metabolic status of all patients were documented. All methods were approved and performed in accordance with guidelines and regulations of the Ethical Committee for Clinical Research (CEIm) from Pere Virgili Research Institute (Ref. CEIm171/2017) ([http://www.iispv.cat/plataformes de suport/en comite-iispv.html](http://www.iispv.cat/plataformes_de_suport/en_comite-iispv.html)). Patient's inclusion criteria were as follows: older than 18 years, diagnosed with PCa by prostate biopsy in our center or any other, and treated by radical prostatectomy in our center. Exclusion criteria were patients with a previous history of cancer, patients older than 75 years, and those who had received any prior treatment before radical prostatectomy for PCa, as described [11].

6. Analytical Methods

Plasma glucose, cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol, insulin levels and hepatic profile and renal profile was performed as described [59]. Levels of sTWEAK in semen were determined in duplicate using commercially available human enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) DuoSet Kits (R&D Systems Europe, Abingdon, UK).

7. Sample Processing

Serum/plasma: blood samples were collected after a fast of at least 12 h, or 2 h after an oral glucose tolerance test. Samples were centrifuged at 4 °C and stored at −80 °C.

Post-digital rectal examination urine: urine samples were collected prior to prostate biopsy or surgical intervention. Samples were centrifuged (2000× g, 10 min, 4 °C), and stored at −80 °C.

Semen: semen samples were centrifuged at 2000× g for 15 min at 22 °C to separate spermatozoa from semen plasma, and the supernatant (semen plasma) was stored at −80 °C.

All samples were processed and stored at the Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) BioBanc (B.0000853 + B.0000854) integrated in the Spanish National Biobanks Platform (PT13/0010/0029 and PT13/0010/0062) for its collaboration.

8. Extracellular Vesicles Extraction from Liquid Biopsy and Exo-oncomiRNA Quantitative Real-Time PCR Profiling

Extracellular vesicles and exo-miRNAs were isolated and extracted from urine and semen samples using the exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit or Midi Kit (Qiagen) [12].

The miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA Synthesis Kit (Exiqon, BioNova Científica, s.l. Madrid, Spain) was used for reverse transcription. The expression profile of the 14 selected exo-oncomiRNAs was further analyzed in urine and semen samples in duplicate, using individual primers on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Data were analyzed by SDS 2.3 and RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems) using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. All values of $C_t > 35$ were excluded for further analysis.

9. Target Search by Bioinformatic Analysis

The targets of the selected exo-oncomiRNAs were searched using three target prediction software packages: (1) The miRanda algorithm (www.microRNA.org) was used to find potential target sites for miRNAs in the genomic sequence. From the miRanda algorithm results, we used the mirSVR score and PhastCons score to decipher which targets were potentially predicted. The mirSVR score is an estimate of the miRNA effect on the mRNA expression level; the more negative the score, the greater the inhibitory effect. PhastCons scores measure the conservation of nucleotide positions across vertebrates of any possible interaction; the higher the PhastCons value, the more conservative across vertebrates and the more important is the complementarity of the miRNA and the target [60]. (2) The Diana-MicroT-CDS predicts targets through the microT-CDS algorithm giving a miTG score, which is a general score for the predicted interaction. The closer the score is to 1, the greater the prediction confidence [61]. (3) Finally, we used the miRWalk platform. The calculated score is generated by executing the TarPmiR algorithm for miRNA target site prediction. The closer the score is to 1, the greater is the confidence prediction, in the same way as Diana-MicroT-CDS [62].

Candidate targets with an miR-SVR score equal or to less than -0.1 ; a PhastCons value equal or greater to 0.56 and, an miTG and miRWalk score equal or greater to 0.8 were considered as potential targets of exo-oncomiR-221-3p.

10. Functional Studies

Functional studies were performed in PC-3 cells cultured in 6-well plates and grown at 90% confluence. Cells were transfected using Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and OPTI-MEM medium (Gibco) with a locked nucleic acid probe containing a specific sequence antisense oligonucleotide targeting exo-oncomiR-221-3p, miRCURY LNA exo-oncomiR-221-3p Power Inhibitor (Qiagen). A scrambled miRNA sequence, miRCURY LNA Power Inhibitor Control A (Qiagen), served as a negative control. Each condition was incubated for 24 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C before stimulation for 24 h with 100 ng/mL TWEAK (Pepro-Tech) in serum-free media. After stimulation, cells were harvested for protein and RNA analysis. Expression analyses of target genes were performed using commercial individual primers on a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Protein analysis and Western blotting were performed using standard protocols. Nitrocellulose membranes were probed with the following primary antibodies that were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA): TCF12/HEB (#11825) and NLK (#94350) and NF- κ B2 p100 (#4882). An anti- β -actin (A11126) antibody was purchased from Sigma-Aldrich. The standard molecular weight marker used was purchased from New England Biolabs Inc. (Herts, UK). Western blots were developed with SuperSignal West Femto chemiluminescence substrate (Pierce Biotechnology, Boston, MA, USA) and visualized with VersaDoc imaging system and Quantity One software (Bio-Rad) (Supplementary Materials).

4.11. Statistical Analysis

For in vitro assays, experimental results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) of 3–4 experiments. Statistical significance was assessed with Student's *t*-test. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

For human samples studies, the sample size was calculated to determine differences between exo-oncomiRNA expression levels in liquid biopsy with respect to the degree of aggressiveness of the tumor (low-risk/high-risk) in those patients diagnosed with PCa. We assumed a two-fold change difference between groups and identical standard deviation (SD) between the groups; therefore, a minimum of 35 patients was needed in each group (bilateral alpha error 0.05, power 90%). Statistical analysis were performed as described [11]. Briefly, for anthropometric and clinical variables, data are expressed as mean \pm SD. Before statistical analysis, normal distribution was evaluated using Levene's test. The non-parametric Mann–Whitney U-test was used to analyze the differences in anthropometric and clinical data and absolute expression levels of the exomiR candidates between patients according to ISUP-GG—low-risk (Group I and II) and high-risk (Group III, Group IV, and Group V). A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. Spearman's Rho test was used as a correlation analysis between anthropometric, clinical, and exo-miRNAs data. Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) and VIP analysis models and binary logistic regression analysis were developed for selected variables. ROC curve analysis was performed to evaluate the best predictive model. The statistical software SPSS Statistics 24.0 (IBM, Madrid, Spain) package and R software (<http://cran.r-project.org>) were used for analysis.

5. Conclusions

TWEAK, exo-oncomiR -221-3p and exo-oncomiR-222-3p are proposed as an improved PCa prognostic panel based on information obtained from a unique biofluid, semen. Further studies in larger cohorts of PCa will be needed as a next step to confirm/validate our panel before it can be adopted in clinical practice.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2072-6694/13/2/250/s1. Table S1: 14 identified exo-oncomiRNAs, Table S2: Exo-oncomiRNAs non-significantly changed when comparing urine or semen biofluids from patients with PCa stratified by risk (low or high), Table S3: Role of elected exo-miR-221-3p targets in cancer, Table S4: List of the selected exo-oncomiR-221-3p and exo-oncomiR-222-3p target's scores, Figure S1: Complete Western blot (WB) results referring to Figure 1b, Figure S2: Spearman's correlation, Figure S3a,b: PLS-DA analysis, Figure S4: Complete WB results referring to Figure 4d.

Author Contributions: Conceptualization, M.R.C., X.R.-P., J.S.-T.; methodology, A.A.-C.; sample collection, review of clinical data and patient recruitment, M.A.-S., J.F.G.-F., J.V.-B. and S.M.-G.; writing—review and editing, M.R.C., X.R.-P., J.S.-T. and A.A.-C.; funding acquisition, M.R.C. and X.R.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by Instituto de Salud Carlos III through projects PI17/00877, PI20/00418 (co-funded by the European Regional Development Fund/European Social Fund; “A way to make future”/“Investing in your future”) and a grant awarded by Fundació Vallformosa “IV Premi Martí Via”. No payment has been received to write this article by a pharmaceutical company or other agency.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (Ref.CEim 171/2017).

Informed Consent Statement: Page: 17

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study is contained within the article and the supplementary material.

Acknowledgments: The authors wish to particularly acknowledge the patients enrolled in this study for their participation and to the IISPV BioBanc (B.0000853 + B.0000854) integrated in the Spanish National Biobanks Platform (PT13/0010/0029 and PT13/0010/0062) for its collaboration.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/caac.21492.
2. Markozannes, G.; Tzoulaki, I.; Karli, D.; Evangelou, E.; Ntzani, E.; Gunter, M.J.; Norat, T.; Ioannidis, J.P.; Tsilidis, K.K. Diet, body size, physical activity and risk of prostate cancer: An umbrella review of the evidence. *Eur. J. Cancer* **2016**, *69*, 61–69, doi:10.1016/j.ejca.2016.09.026.
3. Epstein, J.I.; Egevad, L.; Amin, M.B.; Delahunt, B.; Srigley, J.R.; Humphrey, P.A. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **2015**, *40*, 1, doi:10.1097/PAS.0000000000000530.
4. Saini, S. PSA and beyond: Alternative prostate cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* **2016**, *39*, 97–106, doi:10.1007/s13402-016-0268-6.
5. Di Meo, A.; Bartlett, J.; Cheng, Y.; Pasic, M.D.; Yousef, G.M. Liquid biopsy: A step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 1–14, doi:10.1186/s12943-017-0644-5.
6. Greten, F.R.; Grivnenkov, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* **2019**, *51*, 27–41, doi:10.1016/j.immuni.2019.06.025.
7. Winkles, J.A. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: Discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 411–425, doi:10.1038/nrd2488.
8. Maecker, H.; Varfolomeev, E.; Kischkel, F.; Lawrence, D.; LeBlanc, H.; Lee, W.; Hurst, S.; Danilenko, D.; Li, J.; Filvaroff, E.; et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* **2005**, *123*, 931–944, doi:10.1016/j.cell.2005.09.022.
9. Terra, X.; Gómez, D. External validation of sTWEAK as a prognostic noninvasive biomarker for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **2014**, *36*, 1391, doi:10.1002/HED.
10. Avilés-Jurado, F.X.; Terra, X.; Gómez, D.; Flores, J.C.; Raventós, A.; Maymó-Masip, E.; León, X.; Serrano-Gonzalvo, V.; Vendrell, J.; Figuerola, E.; et al. Low blood levels of sTWEAK are related to locoregional failure in head and neck cancer. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* **2015**, *272*, 1733–1741, doi:10.1007/s00405-014-3095-2.
11. Ruiz-Plazas, X.; Rodríguez-Gallego, E.; Alves, M.; Altuna-Coy, A.; Lozano-Bartolomé, J.; Portero-Otin, M.; García-Fontgivell, J.F.; Martínez-González, S.; Segarra, J.; Chacón, M.R. Biofluid quantification of TWEAK/Fn14 axis in combination with a selected biomarker panel improves assessment of prostate cancer aggressiveness. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 1–13, doi:10.1186/s12967-019-2053-6.
12. Enderle, D.; Spiel, A.; Coticchia, C.M.; Berghoff, E.; Mueller, R.; Schlumpberger, M.; Sprenger-Haussels, M.; Shaffer, J.M.; Lader, E.; Skog, J.; et al. Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2012**, *3*, 286–293, doi:10.1371/journal.pone.0136133.
13. Ruivo, C.F.; Adem, B.; Silva, M.; Melo, S.A. The biology of cancer exosomes: Insights and new perspectives. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 6480–6488, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0994.
14. Tkach, M.; Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **2016**, *164*, 1226–1232, doi:10.1016/j.cell.2016.01.043.
15. Pan, J.; Ding, M.; Xu, K.; Yang, C.; Mao, L.J. Exosomes in diagnosis and therapy of prostate cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 97693–97700, doi:10.18632/oncotarget.18532.
16. Huang, C.; Luo, W.-F.; Ye, Y.-F.; Lin, L.; Wang, Z.; Luo, M.-H.; Song, Q.-D.; He, X.-P.; Chen, H.-W.; Kong, Y.; et al. Characterization of Inflammatory Factor-Induced Changes in Mesenchymal Stem Cell Exosomes and Sequencing Analysis of Exosomal microRNAs. *World J. Stem Cells*; **2019**; Volume 11, 859–890, doi:10.4252/wjsc.v11.i10.859.
17. Huang, M.; Narita, S.; Tsuchiya, N.; Ma, Z.; Numakura, K.; Obara, T.; Tsuruta, H.; Saito, M.; Inoue, T.; Horikawa, Y.; et al. Overexpression of Fn14 promotes androgen-independent prostate cancer progression through MMP-9 and correlates with poor treatment outcome. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1589–1596, doi:10.1093/carcin/bgr182.
18. Yin, J.; Morrissey, C.; Barrett, B.; Corey, E.; Ylaja, K.; Hewitt, S.; Fang, L.; Tillman, H.; Lake, R.; Vessella, R.; et al. AR-Regulated TWEAK-FN14 Pathway Promotes Prostate Cancer Bone Metastasis. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 4306–4317, doi:10.1158/0008-5472.can-13-3233.
19. Hu, Y.; Li, D.; Wu, A.; Qiu, X.; Di, W.; Huang, L.; Qiu, L. TWEAK-stimulated macrophages inhibit metastasis of epithelial ovarian cancer via exosomal shuttling of microRNA. *Cancer Lett.* **2017**, *393*, 60–67, doi:10.1016/j.canlet.2017.02.009.
20. Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J.J.; Lötvall, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 654–659, doi:10.1038/ncb1596.
21. Svoronos, A.A.; Engelman, D.M.; Slack, F.J. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3666–3670, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0359.
22. Tang, Z.; Li, D.; Hou, S.; Zhu, X. The cancer exosomes: Clinical implications, applications and challenges. *Int. J. Cancer* **2019**, *ijc.32762*, doi:10.1002/ijc.32762.

23. Wang, J.; Ni, J.; Beretov, J.; Thompson, J.; Graham, P.; Li, Y. Exosomal microRNAs as liquid biopsy biomarkers in prostate cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2020**, *145*, 4–10, doi:10.1016/j.critrevonc.2019.102860.
24. Huang, X.; Yuan, T.; Liang, M.; Du, M.; Xia, S.; Dittmar, R.; Wang, D.; See, W.; Costello, B.A.; Quevedo, F.; et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as Prognostic Markers in Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2015**, *67*, 33–41, doi:10.1016/j.eururo.2014.07.035.
25. Endzelinš, E.; Berger, A.; Melne, V.; Bajo-Santos, C.; Sobolevska, K.; Abols, A.; Rodriguez, M.; Šantare, D.; Rudnickiha, A.; Lietuviētis, V.; et al. Detection of circulating miRNAs: Comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 1–13, doi:10.1186/s12885-017-3737-z.
26. Foj, L.; Ferrer, F.; Serra, M.; Arévalo, A.; Gavagnach, M.; Giménez, N.; Filella, X. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. *Prostate* **2017**, *77*, 573–583, doi:10.1002/pros.23295.
27. Li, Z.; Ma, Y.Y.; Wang, J.; Zeng, X.F.; Li, R.; Kang, W.; Hao, X.K. Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *Oncotargets Ther.* **2015**, *9*, 139–148, doi:10.2147/OTT.S95565.
28. Wani, S.; Kaul, D.; Mavuduru, R.S.; Kakkar, N.; Bhatia, A. Urinary-exosomal miR-2909: A novel pathognomonic trait of prostate cancer severity. *J. Biotechnol.* **2017**, *259*, 135–139, doi:10.1016/j.jbiotec.2017.07.029.
29. Barceló, M.; Castells, M.; Bassas, L.; Vigués, F.; Larriba, S. Semen miRNAs Contained in Exosomes as Non-Invasive Biomarkers for Prostate Cancer Diagnosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–16, doi:10.1038/s41598-019-50172-6.
30. Lee, J.M.; Im, G.-I. PTHrP isoforms have differing effect on chondrogenic differentiation and hypertrophy of mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *421*, 819–824, doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.096.
31. Konoshenko, M.Y.; Lekchnov, E.A.; Vlassov, A.V.; Laktionov, P.P. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 8545347, doi:10.1155/2018/8545347.
32. Fay, M.P.; Shih, J.H. Permutation tests using estimated distribution functions. *J. Am. Stat. Assoc.* **1998**, *93*, 387–396, doi:10.1080/01621459.1998.10474120.
33. Song, J.; Ouyang, Y.; Che, J.; Li, X.; Zhao, Y.; Yang, K.; Zhao, X.; Chen, Y.; Fan, C.; Yuan, W. Potential value of miR-221/222 as diagnostic, prognostic, and therapeutic biomarkers for diseases. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1–9, doi:10.3389/fimmu.2017.00056.
34. Goto, Y.; Kojima, S.; Nishikawa, R.; Kurozumi, A.; Kato, M.; Enokida, H.; Matsushita, R.; Yamazaki, K.; Ishida, Y.; Nakagawa, M.; et al. MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: The microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. *Br. J. Cancer* **2015**, *113*, 1055–1065, doi:10.1038/bjc.2015.300.
35. Coarfa, C.; Fiskus, W.; Eedunuri, V.K.; Rajapakshe, K.; Foley, C.; Chew, S.A.; Shah, S.S.; Geng, C.; Shou, J.; Mohamed, J.S.; et al. Comprehensive proteomic profiling identifies the androgen receptor axis and other signaling pathways as targets of microRNAs suppressed in metastatic prostate cancer. *Oncogene* **2016**, *35*, 2345–2356, doi:10.1038/ncr.2015.295.
36. Lobo, J.; Gillis, A.J.; van den Berg, A.; Dorsers, L.C.; Belge, G.; Dieckmann, K.P.; Roest, H.P.; van der Laan, L.J.W.; Gietema, J.; Robert J. Hamilton Looijenga Identification and Validation Model for Informative Liquid Biopsy-Based microRNA Biomarkers: Insights from Germ Cell Tumor In Vitro, In Vivo and Patient-Derived Data João. *Cells* **2019**, *8*, 1637, doi:10.3390/cells8121637.
37. Peng, Y.; Croce, C.M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2016**, *1*, 15004, doi:10.1038/sigtrans.2015.4.
38. Agaoglu, F.Y.; Kovancilar, M.; Dizdar, Y.; Darendeliler, E.; Holdenrieder, S.; Dalay, N.; Gezer, U. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumor Biol.* **2011**, *32*, 583–588, doi:10.1007/s13277-011-0154-9.
39. Drabovich, A.P.; Saraon, P.; Jarvi, K.; Diamandis, E.P. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat. Rev. Urol.* **2014**, *11*, 278–288, doi:10.1038/nrurol.2014.74.
40. Eskra, J.N.; Rabizadeh, D.; Pavlovich, C.P.; Catalona, W.J.; Luo, J. Approaches to urinary detection of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2019**, *22*, 362–381, doi:10.1038/s41391-019-0127-4.
41. Song, Q.; An, Q.; Niu, B.; Lu, X.; Zhang, N.; Cao, X. Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism. *J. Oncol.* **2019**, *2*, 7252013, doi:10.1155/2019/7252013.
42. Mercatelli, N.; Coppola, V.; Bonci, D.; Miele, F.; Costantini, A.; Guadagnoli, M.; Bonanno, E.; Muto, G.; Frajese, G.V.; De Maria, R.; et al. The inhibition of the highly expressed mir-221 and mir-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e4029, doi:10.1371/journal.pone.0004029.
43. Zhou, C.F.; Ma, J.; Huang, L.; Yi, H.Y.; Zhang, Y.M.; Wu, X.G.; Yan, R.M.; Liang, L.; Zhong, M.; Yu, Y.H.; et al. Cervical squamous cell carcinoma-secreted exosomal miR-221-3p promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by targeting VASH1. *Oncogene* **2019**, *38*, 1256–1268, doi:10.1038/s41388-018-0511-x.
44. Pan, X.; Hong, X.; Lai, J.; Cheng, L.; Cheng, Y.; Yao, M.; Wang, R.; Hu, N. Exosomal MicroRNA-221-3p Confers Adriamycin Resistance in Breast Cancer Cells by Targeting PIK3R1. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 441, doi:10.3389/fonc.2020.00441.
45. Ghosh, S.; Bhowmik, S.; Majumdar, S.; Goswami, A.; Chakraborty, J.; Gupta, S.; Aggarwal, S.; Ray, S.; Chatterjee, R.; Bhattacharyya, S.; et al. The exosome encapsulated microRNAs as circulating diagnostic marker for hepatocellular carcinoma with low alpha-fetoprotein. *Int. J. Cancer* **2020**, *147*, 2934–2947, doi:10.1002/ijc.33111.
46. Larrabeiti-Etxebarria, A.; Lopez-Santillan, M.; Santos-Zorroza, B.; Lopez-Lopez, E.; Garcia-Orad, A. Systematic review of the potential of MicroRNAs in diffuse large B cell lymphoma. *Cancers* **2019**, *11*, 144, doi:10.3390/cancers11020144.
47. Wu, Y.; Wei, J.; Zhang, W.; Xie, M.; Wang, X.; Xu, J. Serum exosomal miR-1290 is a potential biomarker for lung adenocarcinoma. *Oncotargets Ther.* **2020**, *13*, 7809–7818, doi:10.2147/OTT.S263934.

48. Kristensen, H.; Thomsen, A.R.; Haldrup, C.; Dyrskjød, L.; Hoyer, S.; Borre, M.; Mouritzen, P.; Ørntoft, T.F.; Sørensen, K.D. Novel diagnostic and prognostic classifiers for prostate cancer identified by genome-wide microRNA profiling. *Oncotarget* **2016**, *7*, 30760–30771, doi:10.18632/oncotarget.8953.
49. Kurul, N.O.; Ates, F.; Yilmaz, I.; Narli, G.; Yesildal, C.; Senkul, T. The association of let-7c, miR-21, miR-145, miR-182, and miR-221 with clinicopathologic parameters of prostate cancer in patients diagnosed with low-risk disease. *Prostate* **2019**, *79*, 1125–1132, doi:10.1002/pros.23825.
50. Galardi, S.; Mercatelli, N.; Giorda, E.; Massalini, S.; Frajese, G.V.; Ciafrè, S.A.; Farace, M.G. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23716–23724, doi:10.1074/jbc.M701805200.
51. He, X.Y.; Tan, Z.L.; Mou, Q.; Liu, F.J.; Liu, S.; Yu, C.W.; Zhu, J.; Lv, L.Y.; Zhang, J.; Wang, S.; et al. microRNA-221 enhances MYCN via targeting nemo-like kinase and functions as an oncogene related to poor prognosis in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 2905–2918, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1591.
52. Huang, Y.; Yang, Y.; He, Y.; Li, J. The emerging role of Nemo-like kinase (NLK) in the regulation of cancers. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 9147–9152, doi:10.1007/s13277-015-4159-7.
53. Emami, K.H.; Brown, L.G.; Pitts, T.E.M.; Sun, X.; Vessella, R.L.; Corey, E. Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Prostate* **2009**, *69*, 1481–1492, doi:10.1002/pros.20998.
54. Kishore, S.; Jaskiewicz, L.; Burger, L.; Hausser, J.; Khorshid, M.; Zavolan, M. A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 559–567, doi:10.1038/nmeth.1608.
55. Mullany, L.E.; Herrick, J.S.; Wolff, R.K.; Stevens, J.R.; Samowitz, W.; Slattery, M.L. Transcription factor-microRNA associations and their impact on colorectal cancer survival. *Mol. Carcinog.* **2017**, *56*, 2512–2526, doi:10.1002/mc.22698.
56. Chen, W.S.; Chen, C.C.; Chen, L.L.; Lee, C.C.; Huang, T.S. Secreted heat shock protein 90 α (HSP90 α) induces nuclear factor- κ B-mediated TCF12 protein expression to down-regulate E-cadherin and to enhance colorectal cancer cell migration and invasion. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 9001–9010, doi:10.1074/jbc.M112.437897.
57. Chen, Q.B.; Liang, Y.K.; Zhang, Y.Q.; Jiang, M.Y.; Han, Z.D.; Liang, Y.X.; Wan, Y.P.; Yin, J.; He, H.C.; Zhong, W. De Decreased expression of TCF12 contributes to progression and predicts biochemical recurrence in patients with prostate cancer. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, doi:10.1177/1010428317703924.
58. Zhang, M.; Xiao, X.; Xiong, D.; Liu, Q. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *J. Artif. Intell. Res.* **2014**, *50*, 1–30, doi:10.1613/jair.4265.
59. Vendrell, J.; Maymó-Masip, E.; Tinahones, F.; García-España, A.; Megia, A.; Caubet, E.; García-Fuentes, E.; Chacón, M.R. Tumor necrosis-like weak inducer of apoptosis as a proinflammatory cytokine in human adipocyte cells: Up-regulation in severe obesity is mediated by inflammation but not hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 2983–2992, doi:10.1210/jc.2009-2481.
60. Riffo-Campos, Á.L.; Riquelme, I.; Brebi-Mieville, P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1987, doi:10.3390/ijms17121987.
61. Willkomm, S.; Zander, A.; Grohmann, D. Drug Target miRNA. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1517*, 291–304, doi:10.1007/978-1-4939-6563-2.
62. Sticht, C.; De La Torre, C.; Parveen, A.; Gretz, N. Mirwalk: An online resource for prediction of microrna binding sites. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206239, doi:10.1371/journal.pone.0206239.

Supplementary Material: Liquid Biopsy-Based Exo-oncomiRNAs Can Predict Prostate Cancer Aggressiveness

Xavier Ruiz-Plazas, Antonio Altuna-Coy, Marta Alves-Santiago, José Vila-Barja, Joan Francesc García-Fontgivell, Salomé Martínez-González, José Segarra-Tomás and Matilde R. Chacón

Table S1. List of the 14 selected exo-oncomiRNAs and fold-change that accomplished the following criteria: Ct < 33 and > 1.8 fold over-expression when comparing PC-3 and/or LNCaP cell lines treated with sTWEAK.

Exo-oncomiRNA	Fold Change		
	PC-3 vs PC-3 + sTWEAK	LNCaP vs LNCaP + sTWEAK	PC-3 + sTWEAK vs LNCaP + sTWEAK
miR-125b-1-3p	-	1.83	-
miR-193b-3p	-	-	14.03
miR-221-3p	3.87	-	-
miR-222-3p	2.05	-	-
miR-23a-3p	-	-	5.24
miR-27a-3p	-	2.25	-
miR-29a-3p	-	-	2.14
miR-31-5p	1.82	-	-
miR-497-5p	-	-	3.67
miR-643	2.96	-	-
miR-663b	-	2.27	-
miR-940	2.11	-	-
miR-9-5p	-	2.81	-
miR-99a-3p	-	2.95	-

Table S2. List of the 9 out of 14 selected exo-oncomiRNAs that did not show differences when comparing urine or semen biofluids from PCA patients stratified by risk (low or high).

	ISUP-GG Classification						
	Low-Risk (Group I and II) N = 57			High-Risk (Group III, IV & V) N = 40			p-Value
	Mean	±	S.D	Mean	±	S.D	
<i>Exo-oncomiRNAs in semen - Relative expression levels</i>							
miR-125b-2-3p	1.49	±	0.78	1.99	±	1.58	0.408
miR-193b-3p	0.99	±	0.54	0.99	±	0.42	0.723
miR-23a-3p	1.54	±	0.69	2.15	±	3.54	0.439
miR-27a-3p	1.66	±	1.02	1.44	±	0.80	0.487
miR-29a-5p	2.05	±	1.29	1.98	±	1.32	0.865
miR-497-5p	0.99	±	0.58	0.91	±	0.34	0.844
miR-643	0.44	±	0.39	0.63	±	0.52	0.185
miR-663b	1.68	±	2.52	2.68	±	4.68	0.865
miR-9-5p	0.98	±	0.80	2.34	±	2.83	0.131
miR-940	1.40	±	2.41	2.46	±	2.89	0.265
miR-99a-3p	1.25	±	0.66	1.27	±	0.52	0.762
<i>Exo-oncomiRNAs in urine - Relative expression levels</i>							
miR-125b-2-3p	0.05	±	0.06	0.04	±	0.03	0.549
miR-221-3p	0.03	±	0.03	0.02	±	0.01	0.555
miR-222-3p	0.03	±	0.04	0.02	±	0.03	0.838
miR-23a-3p	0.07	±	0.04	0.06	±	0.03	0.404
miR-29a-3p	0.03	±	0.04	0.02	±	0.03	0.085
miR-31-5p	0.02	±	0.01	0.02	±	0.02	0.222
miR-497-5p	0.02	±	0.03	0.02	±	0.02	0.476
miR-643	0.30	±	1.12	0.13	±	0.28	0.716
miR-663b	0.04	±	0.08	0.02	±	0.04	0.500
miR-9-5p	0.12	±	0.16	0.16	±	0.28	0.583

miR-940	0.10	±	0.12	0.12	±	0.15	0.640
miR-99a-3p	0.03	±	0.05	0.02	±	0.01	0.713

Table S3. Predicted miR-221-3p targets.

Target Gene Symbol	Gene Name	Biological Function	Role Associated with Cancer
TCF12	Transcription Factor 12	May participate in regulating lineage-specific gene expression through the formation of heterodimers	Colorectal cancer survival [1] Ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion [2] High expression contributes to gastric cancer development [3] Decreased expression associated with PCa biochemical recurrence [4]
SNAP23	Synaptosome Associated Protein 23	Regulator of transport vesicle docking and fusion	Suppresses cervical cancer progression [5] Hiperexpression promotes ovarian cancer [6].
DPP8	Dipeptidyl Peptidase 8	May play a role in T-cell activation and immune function	Inhibition induces cell death in multiple myeloma [7] Expression may be related to less aggressive disease in advanced-stage ovarian cancer [8]
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	The protein is a co-factor for transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1	Alters gene expression of tumor growth-related protein COX-2 in squamous cell carcinoma [9] Increased activity promotes tumor progression [10]
NLK	Nemo Like Kinase	Serine/threonine-protein kinase that regulates a number of transcription factors with key roles in cell fate determination.	mRNA and protein expression was significantly increased in laryngeal carcinoma tissues compared with those in adjacent tissues [11] Inhibits androgen receptor signaling in PCa cells [12]
ZFP36L2	ZFP36 Ring Finger Protein Like 2	Nuclear transcription factor most likely functions in regulating the response to growth factors	Promotes pancreatic cancer aggressiveness[13]
FNIP2	Folliculin Interacting Protein 2	May play a role cellular metabolism and nutrient sensing by regulating the AMPK-mechanistic target	Possible role in Kidney tumor progression [14] Somatic mutation associated with gastric and colon cancers [15]
ESR1	Estrogen Receptor 1	Essential for sexual development and reproductive function	Mutation are associated with advanced breast cancer [16]
HIPK1	Homeodomain Interacting Protein Kinase 1	Phosphorylates homeodomain transcription factors and may also function as a co-repressor for homeodomain transcription factors	Down regulation in human colorectal adenocarcinoma cells modulates resistance to Methotrexate [17] Regulation of breast cancer stem cell Heterogeneity via targeting HIPK1/beta-Catenin Axis [18]
SCARB2	Scavenger Receptor Class B Member 2	May participate in membrane transportation and the reorganization of endosomal/lysosomal compartment	Role in the regulation of intracellular vesicle trafficking of lysosomes and endosomes in human breast cancer cells [19]

References

- Mullany, L.E.; Herrick, J.S.; Wolff, R.K.; Stevens, J.R.; Samowitz, W.; Slattery, M.L. Transcription factor-microRNA associations and their impact on colorectal cancer survival. *Mol. Carcinog.* **2017**, *56*, 2512–2526, doi:10.1002/mc.22698.
- Gao, S.; Bian, T.; Su, M.; Liu, Y.; Zhang, Y. miR-26a inhibits ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting TCF12. *Oncol. Rep.* **2019**, *43*, 368–374, doi:10.3892/or.2019.7417.
- Wang, X.; Gao, S.; Xie, F.; Li, W.; Li, M.; Yan, N.; Gao, T.; Fang, L. High expression of TCF12 contributes to gastric cancer development via being target regulated by miR-183 and activating PI3K/AKT pathway. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 13903–13911, doi:10.1002/jcb.28664.
- Chen, Q.-B.; Liang, Y.-K.; Zhang, Y.-Q.; Jiang, M.-Y.; Han, Z.-D.; Liang, Y.-X.; Wan, Y.-P.; Ying-Ke, L.; He, H.-C.; Zhong, W.-D. Decreased expression of TCF12 contributes to progression and predicts biochemical recurrence in patients with prostate cancer. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, doi:10.1177/1010428317703924.
- Zhu, B.; Zhang, Q.; Wu, Y.; Luo, J.; Zheng, X.; Xu, L.; Lu, E.; Qu, J.; Ren, B. SNAP23 suppresses cervical cancer progression via modulating the cell cycle. *Gene* **2018**, *673*, 217–224, doi:10.1016/j.gene.2018.06.028.

6. Sun, Q.; Huang, X.; Zhang, Q.; Qu, J.; Shen, Y.; Wang, X.; Sun, H.; Wang, J.; Xu, L.; Chen, X.; et al. SNAP23 promotes the malignant process of ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* **2016**, *9*, 1–9, doi:10.1186/s13048-016-0289-9.
7. Sato, T.; Tatekoshi, A.; Takada, K.; Iyama, S.; Kamihara, Y.; Jawaid, P.; Rehman, M.U.; Noguchi, K.; Kondo, T.; Kajikawa, S.; et al. DPP8 is a novel therapeutic target for multiple myeloma. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–8, doi:10.1038/s41598-019-54695-w.
8. Brunetti, M.; Holth, A.; Panagopoulos, I.; Staff, A.C.; Micci, F.; Davidson, B. Expression and clinical role of the dipeptidyl peptidases DPP8 and DPP9 in ovarian carcinoma. *Virchows Archiv* **2018**, *474*, 177–185, doi:10.1007/s00428-018-2487-x.
9. Chang, K.-Y.; Shen, M.-R.; Lee, M.-Y.; Wang, W.-L.; Su, W.-C.; Chang, W.-C.; Chen, B.-K. Epidermal Growth Factor-activated Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator/HIF-1 β Signal Pathway Up-regulates Cyclooxygenase-2 Gene Expression Associated with Squamous Cell Carcinoma. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9908–9916, doi:10.1074/jbc.m806210200.
10. Semenza, G.L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, S62–S67, doi:10.1016/s1471-4914(02)02317-1.
11. Shen, N.; Duan, X.-H.; Wang, X.-L.; Yang, Q.-Y.; Feng, Y.; Zhang, J.-X. Effect of NLK on the proliferation and invasion of laryngeal carcinoma cells by regulating CDCP1. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci* **2019**, *23*, 6226–6233.
12. Emami, K.H.; Brown, L.G.; Pitts, T.E.; Sun, X.; Vessella, R.L.; Corey, E. Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Prostate* **2009**, *69*, 1481–1492, doi:10.1002/pros.20998.
13. Yonemori, K.; Seki, N.; Kurahara, H.; Osako, Y.; Idichi, T.; Arai, T.; Koshizuka, K.; Kita, Y.; Maemura, K.; Natsugoe, S. ZFP36L2 promotes cancer cell aggressiveness and is regulated by antitumor microRNA-375 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 124–135, doi:10.1111/cas.13119.
14. Hasumi, H.; Baba, M.; Hasumi, Y.; Lang, M.; Huang, Y.; Oh, H.F.; Matsuo, M.; Merino, M.J.; Yao, M.; Ito, Y.; et al. Folliculin-interacting proteins Fnip1 and Fnip2 play critical roles in kidney tumor suppression in cooperation with Flcn. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, E1624–E1631, doi:10.1073/pnas.1419502112.
15. Mo, H.Y.; Son, H.J.; Choi, E.J.; Yoo, N.J.; An, C.-H.; Lee, S.H. Somatic mutations of candidate tumor suppressor genes folliculin-interacting proteins FNIP1 and FNIP2 in gastric and colon cancers. *Pathol. - Res. Pr.* **2019**, *215*, 152646, doi:10.1016/j.prp.2019.152646.
16. Lee, N.; Park, M.-J.; Song, W.; Jeon, K.; Jeong, S. Currently Applied Molecular Assays for Identifying *ESR1* Mutations in Patients with Advanced Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8807, doi:10.3390/ijms21228807.
17. Zhang, D.; Li, Y.; Sun, P. miR-770-5p modulates resistance to methotrexate in human colorectal adenocarcinoma cells by downregulating HIPK1. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *19*, 339–346, doi:10.3892/etm.2019.8221.
18. Liu, B.; Du, R.; Zhou, L.; Xu, J.; Chen, S.; Chen, J.; Yang, X.; Liu, D.-X.; Shao, Z.-M.; Zhang, L.; et al. miR-200c/141 Regulates Breast Cancer Stem Cell Heterogeneity via Targeting HIPK1/ β -Catenin Axis. *Theranostics* **2018**, *8*, 5801–5813, doi:10.7150/thno.29380.
19. Nishimura, Y.; Yoshioka, K.; Bernard, O.; Himeno, M.; Itoh, K. LIM kinase 1: evidence for a role in the regulation of intracellular vesicle trafficking of lysosomes and endosomes in human breast cancer cells. *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 369–380, doi:10.1078/0171-9335-00382.

Table S4. List of the selected exo-oncomiR-221-3p and exo-oncomiR-222-3p target's scores.

Score	MicroRNA Target Prediction Databases							
	miRanda-miRSVR		PhastCons		Diana-MicroT-CDS		miRWalk	
	miRSVR				miTG		miRWalk	
Targets	exo-miR-221-3p	exo-miR-222-3p	exo-miR-221-3p	exo-miR-222-3p	exo-miR-221-3p	exo-miR-222-3p	exo-miR-221-3p	exo-miR-222-3p
TCF12	-3.002	-2.370	0.649; 0.816; 0.802#	0.649; 0.816; 0.802#	0.880	0.861	0.882	0.807
SNAP23	-1.192	-1.191	0.643	0.648	0.770	0.789	0.846	0.801
DPP8	-1.187	-1.181	0.650	0.650	0.827	0.805	0.962	0.923
ARNT	-1.160	-1.172	0.772	0.772	0.829	0.836	0.837	0.923
NLK	-1.101	-1.099	0.777	0.777	0.878	0.868	0.846	0.823
ZFP36L2	-0.587	-0.608	0.578	0.578	0.961	0.956	0.923	0.846
FNIP2	-0.438	-0.404	0.591	0.586	0.981	0.947	0.897	1.000
ESR1	-1.128	-0.844	0.569; 0.719#	0.719	0.768	0.702	0.955	1.000
HIPK1	-0.824	-0.851	0.831	0.831	0.825	0.956	0.923	0.923
SCARB2	-0.426	-0.429	0.692	0.692	0.798	0.829	0.846	0.846

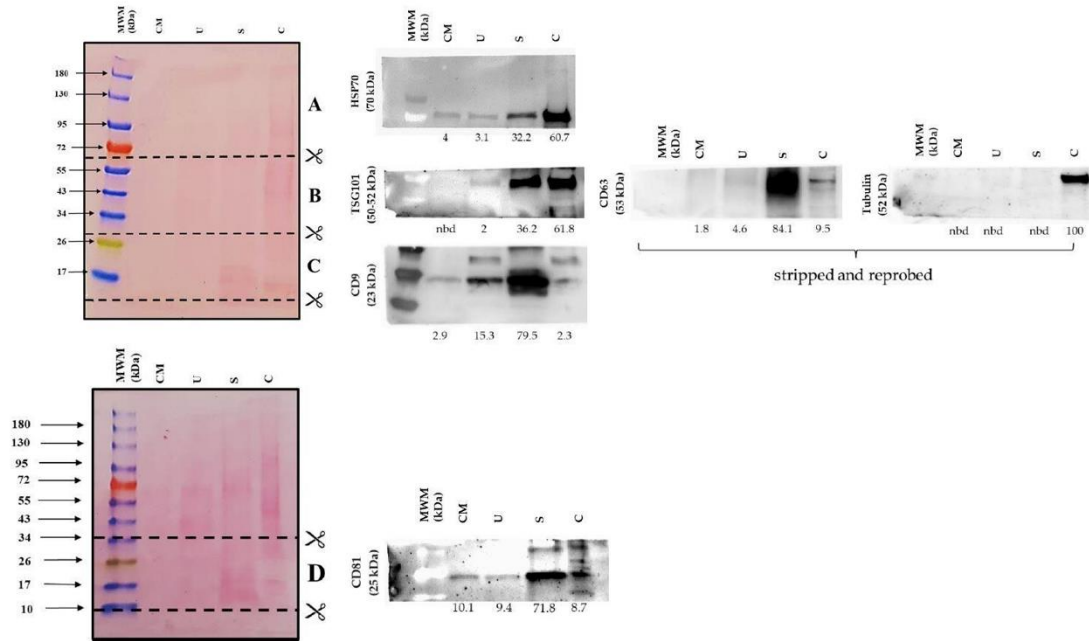


Figure S1. Complete WB results referring to Figure 1. Ponceau stained images of gel transferred-membranes cut before antibody incubation to allow detection of CD9, TSG101, HSP70 proteins (A,B,C). Then stripping off was performed and membranes were reprobed with CD63 and Tubulin antibodies (D). A separate gel was run and incubated with CD81 antibody. The numbers below the membranes represent the percentage of intensity. CM: culture media, U: urine, S: semen, C: PC-3 cell extract nbd: no band detected.

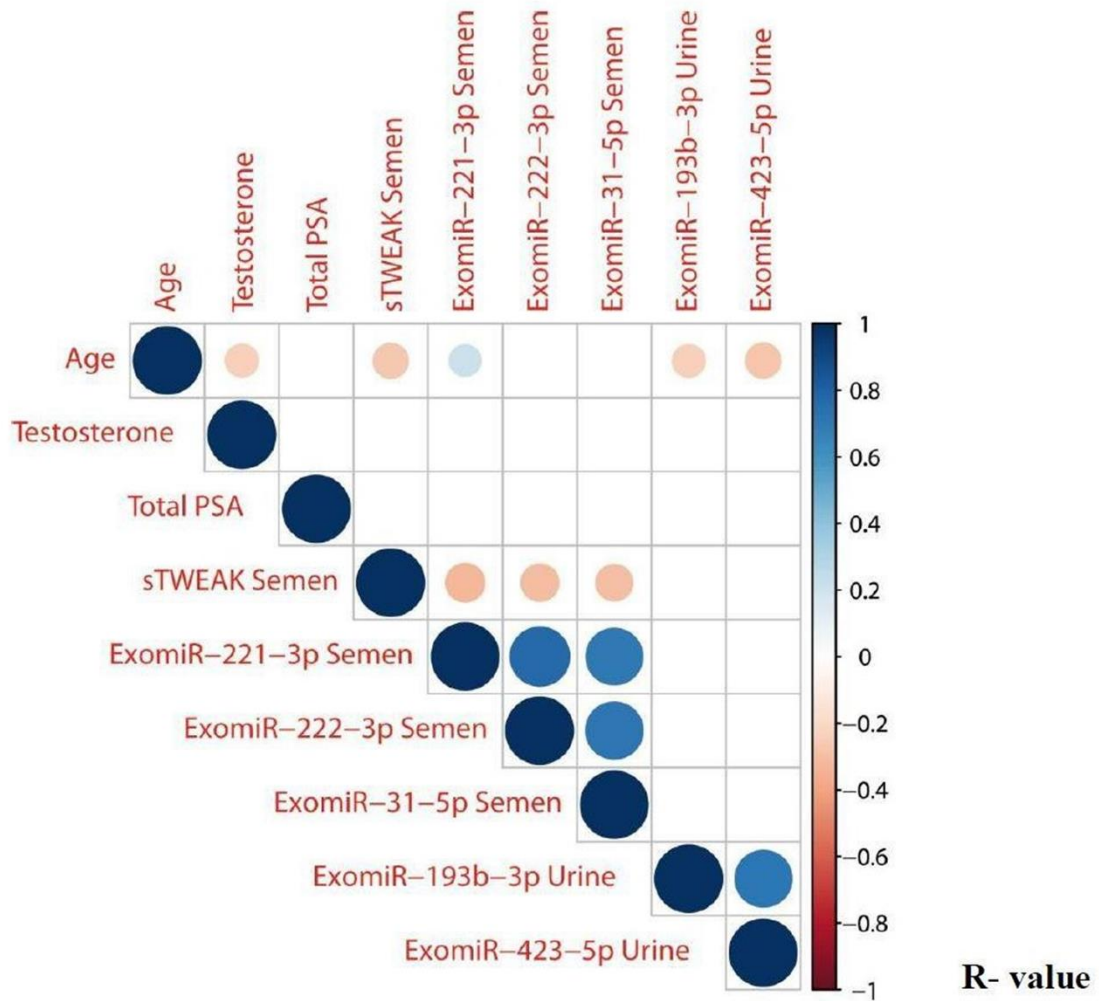


Figure S2. Spearman correlation matrix. Correlation map plotted using significance levels for Spearman’s test performed with relevant clinical and biomarker data from all studied patients. Positive correlations are displayed in grading-blue and negative correlations in grading-red color. Correlations with p -value ≥ 0.05 are considered as insignificant and are left blank. Color intensity and the size of the circle are proportional to the correlation coefficients. In the right side of the correlogram, the legend color shows the correlation coefficients and the corresponding colors.

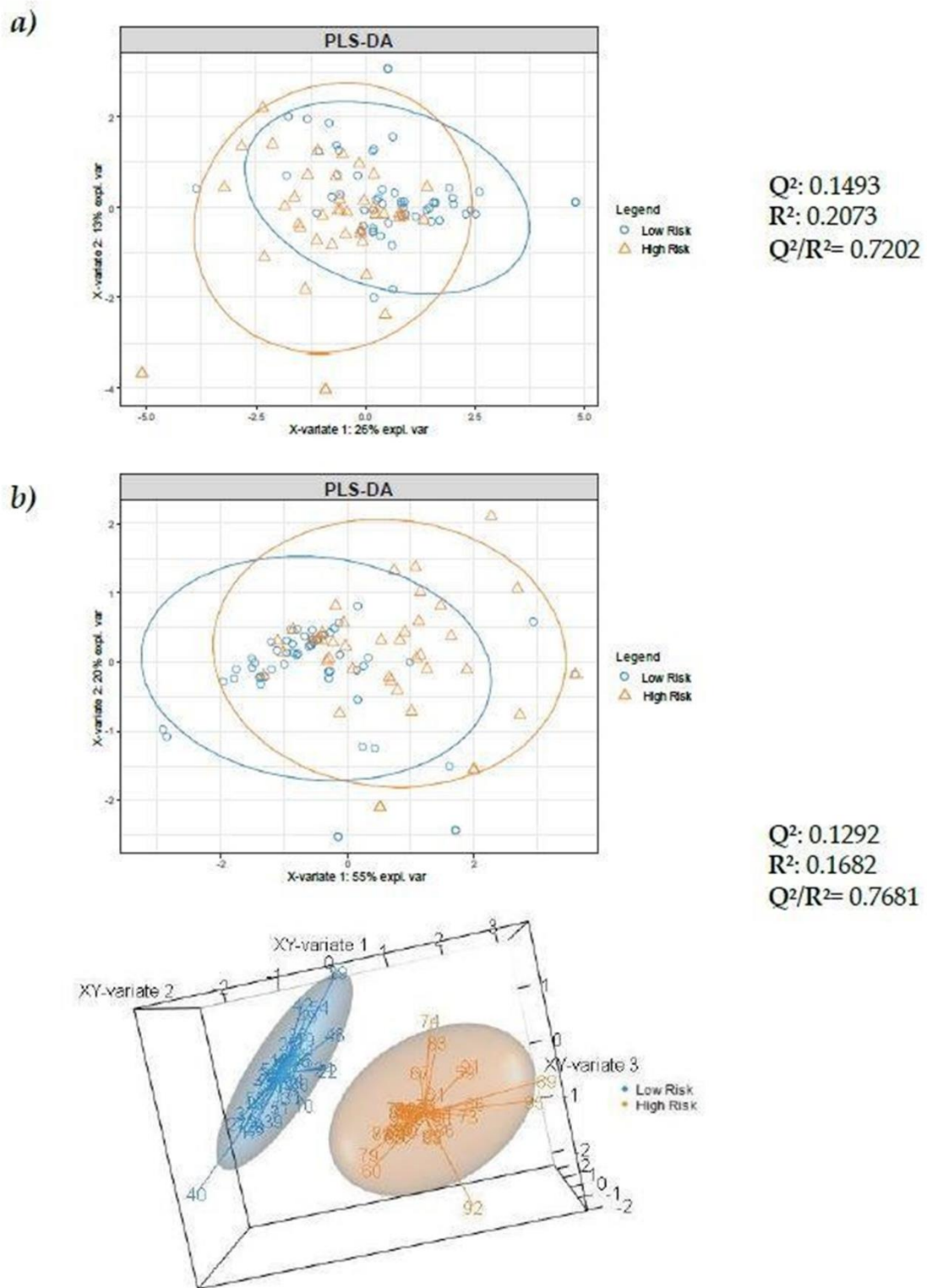


Figure S3. (a) Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) model in order to evaluate the potential of the 5 selected exo-oncomiRNAs plus PSA in serum, sTWEAK in semen, Age, Prostatic volume, Testosterone in the stratification of PCa aggressiveness. (b) PLS-DA model in order to evaluate the potential of the ROC model (sTWEAK in semen, exo-oncomiR-221-3p and exo-oncomiR-222-3p in semen) in 2-dimension and 3-dimension. Both models were evaluated using R², Q² and Q²/R² metrics. A model is considered predictive when Q²/R² ratio is greater than 0.5.



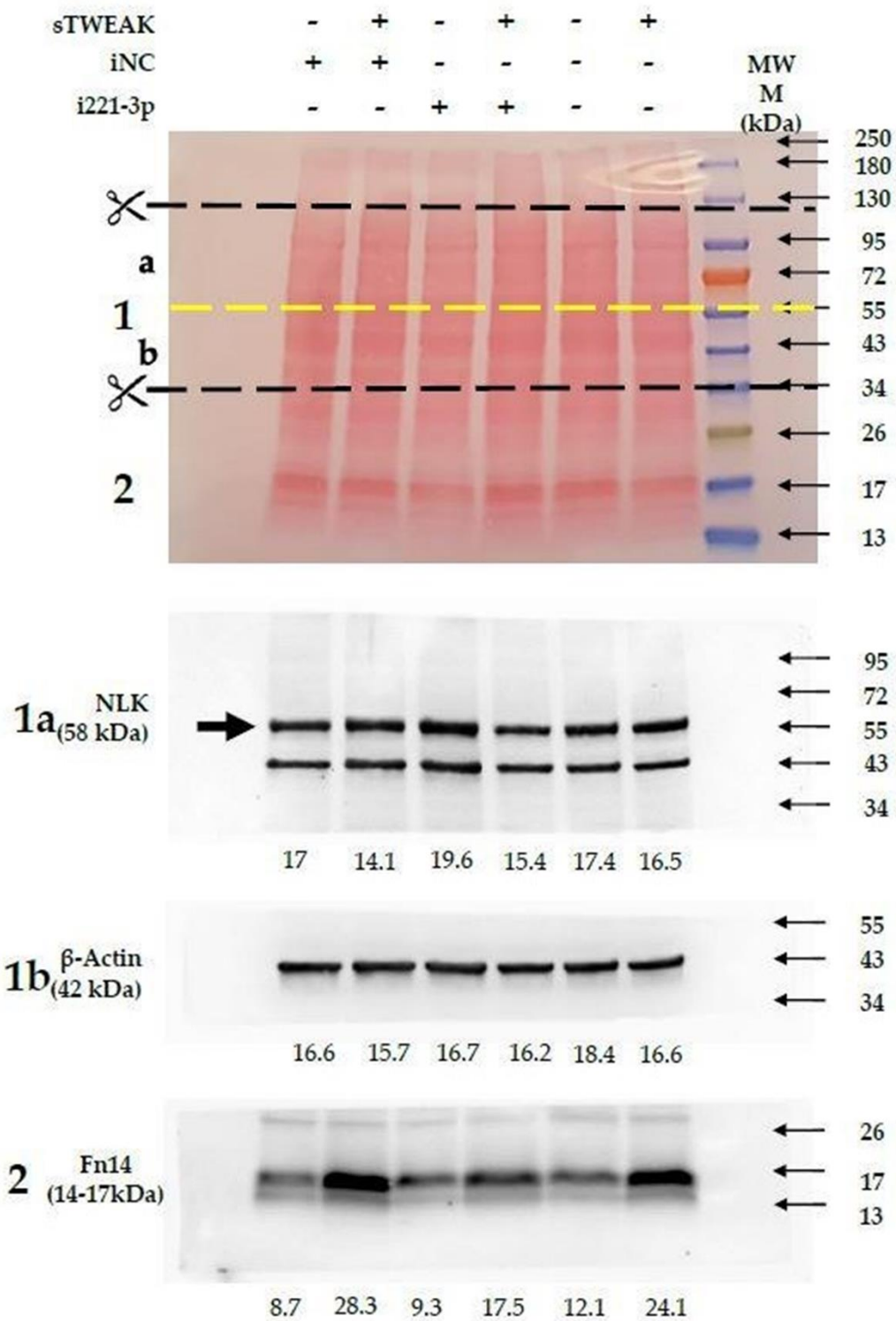


Figure S4. Complete WB results referring to Figure 4d. The membranes were cut before antibody incubation to allow multiple detection of a single gel without stripping off antibodies. Therefore, no complete membranes can be shown for this experiment. The numbers below membranes represent the percentage of intensity.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Discusión

DISCUSIÓN

El CaP es uno de los tumores más prevalentes en hombres (2). A principios de los años 90, disminuyó significativamente la mortalidad del CaP gracias a la utilización de los niveles de PSA en sangre como prueba de cribado para el diagnóstico (34,35). La evolución natural de este tipo de cáncer es indolente y su baja mortalidad ha asociado el cribado de PSA con un sobrediagnóstico y sobretratamiento de tumores indolentes. Todo ello provoca que pacientes con tumores indolentes se vean afectados por los efectos secundarios de los tratamientos radicales (incontinencia urinaria, disfunción eréctil, síntomas del tracto urinario inferior, problemas digestivos, etc.) sin recibir a cambio un aumento de la supervivencia relacionada con el tratamiento (34,35). Por lo tanto son necesarios nuevos biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico que permitan identificar los tumores agresivos que ponen en riesgo la vida del paciente evitar el sobrediagnóstico de tumores indolentes (34).

TWEAK en el contexto inflamatorio del CaP. Efecto sobre el metabolismo celular

Se ha demostrado que la inflamación se asocia con el desarrollo y la progresión de tumores (48). En este sentido, en el microambiente tumoral, se generan especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (35), citocinas proinflamatorias como TNF α (382), IL-1 β (383), IL-6 (51,52), IL-8 (53,54,384) o la interleucina 17 (IL-17) (385), o se secretan también factores de crecimiento tales como TGF- β (386), IGFs (387,388), EGFs (389), FGFs (390) o VEGFs (391) que pueden incidir sobre el crecimiento y la evolución descontrolada del tumor, activando y suprimiendo la expresión de genes que regulan procesos apoptóticos, migratorios y, en consecuencia, alterando el metabolismo celular tumoral. En este sentido, la inflamación crónica en el tejido prostático benigno se asocia con la aparición de cáncer de próstata de alto grado (49).

TWEAK es una citocina proinflamatoria que pertenece a la superfamilia de TNF (101). Esta citocina se localiza anclada a la superficie celular (mTWEAK), pero puede ser liberada a la circulación en forma soluble (sTWEAK) por la acción proteolítica de una furina (101). Cuando TWEAK (tanto mTWEAK como sTWEAK) se une con su receptor *bonafide*, Fn14, puede desencadenar efectos pleiotrópicos tales como apoptosis, inflamación, angiogénesis o migración, según el tipo celular y/o contexto celular dónde actúe (101).

La utilidad del eje TWEAK/Fn14 como biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico se ha estudiado en diferentes patologías asociadas a inflamación de bajo grado y en las que el metabolismo parece ser que tiene un papel crucial, como en la diabetes tipo 2 (392), diabetes tipo 1 (119), la obesidad (393) o la esteatosis hepática (191). En todos estos contextos niveles disminuidos de sTWEAK en sangre se han asociado con el desarrollo de la patología y, en ciertos

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

casos como en pacientes con prediabetes los niveles séricos de sTWEAK pueden ser de utilidad pronóstica (189,393).

En el contexto del cáncer, la utilidad del eje TWEAK/Fn14 como biomarcador se ha estudiado solo en cáncer de cabeza y cuello, dónde niveles séricos disminuidos de sTWEAK se han relacionado con una menor tasa de supervivencia (192,193).

En el contexto del CaP, hay pocos datos en la literatura sobre el papel del eje TWEAK/Fn14. Los primeros estudios realizados son *in vitro* y concluyen que la presencia de TWEAK estaba asociada a procesos tanto apoptóticos, como inflamatorios, migratorios e incluso a un aumento de la adhesión celular (108,160). Por otro lado, en estudios mediante inmunohistoquímica de tejido prostático de pacientes con adenocarcinoma, se detectó un aumento de la expresión de la proteína de Fn14 en la zona tumoral respecto la zona epitelial normal (160). Además, en estudios utilizando modelos de xenoinjertos en ratón, observaron que Fn14 era necesario para el desarrollo de la metástasis ósea (394). En el mismo estudio, mediante inmunohistoquímica de tejido tumoral de próstata humano, asociaron la presencia de la proteína de Fn14 con una menor tasa de supervivencia (394).

Dado que los datos sobre el potencial del eje TWEAK/Fn14 como biomarcador de pronóstico de CaP eran escasos, nos planteamos cuantificar niveles de esta citocina en biopsias líquidas de pacientes con CaP (suero, orina y semen), estratificados en diferentes grados de agresividad del tumor según la clasificación del ISUP (19), en Bajo Riesgo (ISUP I y II) y Alto Riesgo o agresivos (ISUP III, IV y V). Los resultados obtenidos revelaron que aunque sTWEAK estaba presente en las biopsias líquidas analizadas (suero, orina y semen) sólo los niveles de sTWEAK en semen eran significativamente más bajos en el grupo con CaP de Alto Riesgo respecto al grupo de Bajo Riesgo, mientras que los niveles de expresión de ARNm del receptor Fn14 medido en el sedimento celular del semen se encontraba más elevado en los pacientes de Alto Riesgo que en el grupo de Bajo Riesgo, aunque el dato no alcanzó significancia estadística (185). Este hallazgo podría indicar que en este microambiente tumoral se está produciendo una interacción de TWEAK con su receptor Fn14 y una internalización activa, lo que podría provocar una reducción de los niveles de sTWEAK favoreciendo así procesos de proliferación y migración, tal como se han descrito en estudios *in vitro* utilizando modelos celulares de CaP (108,160,394).

Dada la relación establecida entre los niveles de sTWEAK y patologías relacionadas con el metabolismo glucídico (119,392) y lipídico (191), pensamos que la presencia de sTWEAK en biofluidos de pacientes de CaP podría estar relacionada con su estado metabólico. Abordamos esta hipótesis introduciendo un grupo de pacientes sanos para compararlos con un grupo de pacientes con CaP. Interesantemente, los niveles séricos de sTWEAK se detectaron inferiores en el grupo de pacientes con CaP al compararlos con el grupo control (395), dato muy similar al que

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

nos encontramos en estudios anteriores con patologías muy distintas pero que comparten un bajo grado de inflamación sistémica (119,189,393,396).

Cabe destacar que observamos que los niveles séricos de sTWEAK se asociaron no sólo negativamente con los niveles de PSA, sino que además se asociaron con parámetros metabólicos tales como el índice *Homeostatic model assessment-Insulin Resistance* (HOMA-IR) (modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina) y la insulina; y positivamente con los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el colesterol total en nuestra cohorte (395). Mediante el uso de regresión logística binaria, determinamos que los niveles séricos de sTWEAK podrían ser útiles como predictores independiente del CaP, junto con el índice HOMA-IR, los niveles de HDL y los niveles de PSA en suero (395). No observamos asociación entre los niveles de creatinina en sangre y la presencia de CaP aunque sí ha sido reportado (397). Estos hallazgos respaldan datos ya publicados sobre la relación de sTWEAK y el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina como factor de riesgo de CaP (191,398–401). Para confirmar los datos obtenidos, es necesario validarlos en cohortes de mayor tamaño.

Por lo tanto, la observación de que la citocina sTWEAK está presente y desregulada en el semen de pacientes con CaP, sumado a la asociación de los niveles de sTWEAK en suero a parámetros del metabolismo glucídico y lipídico, apuntan a que sTWEAK podría estar afectando el metabolismo celular de este tipo de tumores (395).

El metabolismo en CaP es altamente lipogénico y lipolítico, con tasas relativamente bajas de captación de glucosa en comparación con otros tumores sólidos (56,60). Evidencias científicas demuestran que los marcajes tumorales de próstata que utilizan piruvato o acetato son más útiles que la glucosa marcada a la hora de detectar la presencia del tumor (65,66). Estudios *in vitro*, utilizando las líneas celulares prostáticas LNCaP, PC-3 y RWPE-1 demostraron que el metabolismo glucídico está reducido mientras que la captación de ácidos grasos, y su uso posterior, está aumentada en las líneas de CaP al comprarlas con la línea celular sana (RWPE-1) (402,403). En este sentido, el aumento de la expresión génica en tejido prostático tumoral respecto a tejido sano de enzimas lipogénicas tales como *FASN* o *ACACA*, o el factor de transcripción *SREBP-1*, estrechamente relacionado con el metabolismo lipídico (404), se ha asociado con un peor pronóstico y con una peor tasa de supervivencia (71,72,76,77).

Para estudiar el posible efecto de sTWEAK sobre el metabolismo glucídico y lipídico en el contexto del CaP, utilizamos dos líneas celulares epiteliales cancerígenas: PC-3 (independiente de andrógenos) y LNCaP (dependiente de andrógenos), y la línea celular epitelial no tumorogénica RWPE-1 como control.

El efecto de sTWEAK sobre el metabolismo celular se valoró mediante la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos posterior al estímulo con sTWEAK

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

en las 3 líneas celulares mencionadas anteriormente (PC-3, LNCaP y RWPE-1). Así pues, cuando valoramos el efecto de la presencia de sTWEAK en el metabolismo de la glucosa, observamos que el estímulo de sTWEAK no alteró la expresión de genes relacionados con transportadores de glucosa (*SLC2A4* y *SLC2A1*), pero sí se observó una marcada reducción en la expresión de la hexoquinasa (*HK*) y la fosfofructoquinasa (*PFK*), ambos genes sintetizan enzimas involucradas en el consumo de energía, o también llamada fase preparatoria de la glucólisis (395). Por otro lado, cuando se analizó la expresión de genes implicados en la fase de producción de energía de la glucólisis tales como la piruvato quinasa M2 (*PKM2*) y la piruvato deshidrogenasa 1 (*PDHA1*) y su inhibidor, la piruvato deshidrogenasa lipoamida quinasa isoenzima 4 (*PDK4*), sTWEAK provocó un aumento significativo de la expresión de *PKM2* y *PDHA1*, y una disminución de *PDK4* sólo en la línea celular PC-3, mientras que en las otras dos líneas celulares no se observaron cambios (395). El incremento de *PKM2* podría provocar un aumento de la generación de piruvato, que una vez en la mitocondria podría convertirse en citrato y, finalmente, en ácidos grasos (405) (Figura 24).

Por lo que respecta al metabolismo lipídico, el tratamiento con sTWEAK a las células de la línea PC-3 provocó un claro aumento de la vía de *de novo* lipogénesis (Figura 24) como lo demuestra el aumento observado en la expresión de los genes *ACACA* y *FASN*. Ambos genes están involucrados en la conversión del citrato en ácidos grasos (395). Este efecto se detectó acompañado de un aumento en la expresión a nivel de ARN de genes que codifican factores de transcripción claves en el metabolismo lipídico como *SREBP-1* y *PPARG*, y de transportadores lipídicos tanto de membrana (*CD36*) como citoplasmáticos (*FABP4*) (395). La regulación de la expresión de la enzima *FASN* por parte de sTWEAK es un hecho particularmente relevante, ya que otros autores lo identificaron como oncogén en el contexto del CaP y asociaron su elevada expresión con una reducción en la tasa de supervivencia (71).

El efecto provocado por sTWEAK sobre el metabolismo lipídico en la línea celular PC-3 estaba mediado a través de su receptor *bona fide*, Fn14, puesto que la inhibición mediante inhibidores específicos de ARNm *in vitro*, demostró que la expresión tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico de genes involucrados en la entrada de lípidos en la mitocondria (*CPT1A*), en el transporte y movilización citoplasmática de lípidos (*FABP4*) y en *de novo* lipogénesis (*FASN*) se reducían en paralelo a la inhibición de la expresión de Fn14 (395) (Figura 24). Por otro lado, ratificamos el efecto de sTWEAK sobre el metabolismo lipídico, puesto que el estímulo de sTWEAK aumentó significativamente la captación y acumulación de lípidos intracelulares, y además, ambos procesos se reducían al tratar las células con el inhibidor de ARNm de Fn14 (395) (Figura 24). Los resultados obtenidos claramente apuntan que sTWEAK en la línea celular PC-3 estimula la síntesis, acumulación y oxidación de ácidos grasos, a través de Fn14, potenciando así la agresividad del tumor (62,395) (Figura 24).

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Con el fin de determinar qué vías de señalización podrían estar implicadas en la regulación del metabolismo lípido mediado por el eje TWEAK/Fn14, analizamos las vías de señalización directamente activadas por sTWEAK, y utilizamos la línea celular PC-3 (395). Observamos que la unión de sTWEAK a Fn14, activa las vías de señalización NF- κ B (canónica y no canónica) tal y como ya está descrito (101). Además, también activa las vías de la MAPK, concretamente fosforilando ERK1/2, ya descrita anteriormente en la línea DU145/RasB1 en CaP (406), mientras que no se detectan cambios a nivel de fosforilación de p38 ni de JNK (395), vías que también se han descrito activadas por TWEAK en otros contextos (407,408). También observamos que sTWEAK provocaba la activación de la vía de AKT, mediante la detección de la fosforilación de la serina 473 (395).

Estudios previos en líneas celulares cancerígenas de hígado, vejiga y en líneas de próstata como PC-3 y DU-145 relacionan la activación de la vía ERK1/2 con la fosforilación de PKM2 que, a su vez, se ha demostrado que podría regular la expresión del factor de transcripción SREBP-1 (405,409–411). Cabe mencionar que la implicación de la vía de la AKT en la regulación metabólica celular está documentada en diferentes contextos tumorales tales como glioblastoma, leucemia, cáncer de mama o incluso en CaP, regulando la expresión de FASN, SREBP-1 o FOXO1, entre otros genes (412–415).

La inhibición farmacológica de la señalización de ERK1/2 y AKT en la línea celular PC-3 mediante el uso de inhibidores específicos de estas vías (PD184352 para ERK1/2 (416) y MK2206 para AKT (417)), provocó que la expresión a nivel de ARNm de genes implicados en lipólisis (*CPT1A*), en transporte de lípidos (*FABP4*) y en *de novo* lipogénesis (*FASN*) se redujeran por el efecto de PD184352, mientras que la expresión de los factores de transcripción *SREBP-1* y *PPARG* quedó alterada por ambos inhibidores (395). La utilización de inhibidores de la vía canónica (Parthenolide) y no canónica (Amgen16) de NF- κ B en células PC-3 previo al estímulo con sTWEAK no mostraron implicación de estas vías en el metabolismo lipídico, puesto que no se detectaron cambios en la expresión de ARNm de genes implicados en el metabolismo lipídico tales como *FASN*, *CPT1A*, *FABP4*, *SREBP-1* y *PPARG* (395). Así pues, podemos concluir, basándonos en nuestros hallazgos, que las vías de señalización ERK1/2 y AKT están implicadas en coordinar el control del metabolismo lipídico de sTWEAK en CaP y refuerzan el posible uso terapéutico de ambas vías para futuros tratamientos de tumores prostáticos (Figura 24).

Para finalizar, los datos obtenidos nos permiten concluir que los niveles séricos de sTWEAK pueden ser utilizados como predictor independiente del CaP. A pesar de que los estudios *in vitro* tienen la limitación de no reflejar la complejidad de los procesos biológicos que suceden *in vivo* ni la heterogeneidad del tumor de próstata, sin embargo, son herramientas útiles para explorar los mecanismos subyacentes a la tumorigénesis y la resistencia a los medicamentos. Con los modelos

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

celulares utilizados, hemos demostrado que la presencia de sTWEAK en el microambiente tumoral prostático repercute directamente en la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico potenciando su agresividad. Dado que el bloqueo de Fn14 puede inhibir este efecto metabólico *in vitro*, este receptor podría ser una estrategia terapéutica más para el tratamiento del CaP. Para validar nuestros datos será necesario obtener más datos utilizando inhibidores de bloqueo del eje TWEAK/Fn14 en modelos celulares, animales con el fin ratificar la relación de TWEAK en el metabolismo lipídico del CaP y postular a este eje cómo posible estrategia terapéutica en el contexto del CaP.

Efecto de sTWEAK sobre la secreción de VEs en el microambiente del CaP. Utilidad de exomiRNAs como biomarcadores de pronóstico

La inflamación puede desencadenar la secreción de VEs que pueden estar involucradas en procesos tumorales (418). Existen evidencias que demuestran que las citocinas pueden promover la secreción de VEs. Wang *et al.* y Chaudhuri *et al.* reportaron que el estímulo de TNF α sobre astrocitos aumentaba la secreción de VEs; y el cargo de microRNAs (exomiRNAs) de las VEs liberadas por astrocitos en respuesta a estímulos de IL-1 β y TNF α estaba enriquecido de dos exomiRNAs, el exomiR-125a-5p y el exomiR-16-5p (249,251). Por otro lado, en 2018, Domenis *et al.* demostraron que el estímulo conjunto de INF γ y TNF α a células madre mesenquimales adiposas provocaba la liberación de VEs capaces de polarizar macrófagos a subtipos M2 y revertir la diferenciación hacia M1. El análisis del cargo de dichas VEs contenían exomiRNAs involucrados en el proceso de polarización de macrófagos a M2 (250).

En el contexto del CaP se ha demostrado que las VEs y su cargo de exomiRNAs derivados de modelos celulares de CaP son capaces de inducir cambios funcionales sobre cultivos primarios de osteoclastos y/o ratones C57BL/6, promoviendo metástasis en hueso y además ser utilizado como biomarcadores pronóstico de metástasis (355,419,420).

La ventaja de los exomiRNAs como herramienta diagnóstica y pronóstica reside en la alta estabilidad en la circulación sanguínea y otros fluidos corporales tales como orina, líquido cefalorraquídeo, semen, líquido sinovial entre otros, puesto que al estar encapsuladas en vesículas con doble capa lipídica, la probabilidad de ser degradadas, por exonucleasas, cambios de pH o por las condiciones de almacenamiento de la muestra es realmente baja (341,421–423). Estas características avalan su gran utilidad como biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico en diferentes patologías como cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer hepático o cáncer de mama (296,424–428).

Dado que sTWEAK está presente en el microambiente tumoral del CaP (185), indagamos sobre la posibilidad de si su presencia podría provocar la secreción de VEs y si el cargo en exomiRNAs

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

podría ser útil como biomarcadores de agresividad del CaP capaces de modular el microambiente tumoral.

Nuestros estudios *in vitro* sobre diferentes líneas celulares de CaP (PC-3 y LNCaP) demostraron que la presencia de sTWEAK era capaz de provocar la secreción de VEs. Mediante el marcaje de las VEs con vapor de osmio y su visualización con microscopia electrónica de transmisión y ratificamos que estábamos trabajando con VEs de un tamaño equivalente al de los exosomas (30–150 nm) (429). Además, la detección proteica de marcadores de superficie de membrana (CD9, CD63 y CD81), siguiendo las directrices de la *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV) (429,430), corroboró la identidad de las VEs aisladas. Cuando aislamos el cargo de las VEs en el medio celular después del estímulo con sTWEAK, observamos 14 exomiRNAs regulados por dicha citocina (exomiRNA-125b-1-3p, -193b-3p, -221-3p, -222-3p, -23a-3p, -27a-3p, -29a-3p, -31-5p, -497-5p, -643, -663b, -940, -9-5p y -99a-3p). Sin embargo, al validar los 14 exomiRNAs en biopsias líquidas de semen y orina de pacientes con CaP de Bajo Riesgo (Grupo ISUP I y II) y Alto Riesgo (Grupo ISUP III, IV y V) (19), observamos que la expresión del exomiRNA-221-3p, -222-3p y 31-5p estaba aumentada en semen de los pacientes de Alto Riesgo al compararlos con los de Bajo Riesgo, mientras que la expresión de los exomiRNA-193b-3p y -423-5p estaba disminuida en orina de los pacientes de Alto Riesgo (429). El resto de exomiRNAs (exomiRNA-125b-1-3p, -23a-3p, -31-5p, -497-5p, -643, -663b, -940, -9-5p y -99a-3p) no cambiaron su expresión entre los grupos estudiados en ninguno de los biofluidos analizados (429).

La posibilidad de utilizar los exomiRNAs desregulados en ambos biofluidos en los pacientes con CaP como biomarcadores de pronóstico de la agresividad del CaP fue abordada mediante diferentes herramientas estadísticas.

Se seleccionaron los exomiRNAs desregulados tanto en semen (exomiRNA-221-3p, -222-3p y -31-5p) como en orina (exomiRNA-193b-3p y -423-5p) y los niveles de PSA y testosterona en suero y los niveles de sTWEAK en semen, junto con la edad y el volumen prostático, ambos factores de riesgo de CaP (3) y utilizamos el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para evaluar si este panel permitía estratificar correctamente los pacientes según el grado de agresividad. Obtuvimos que el modelo tenía una precisión del 72%, lo que nos indicó que este panel es capaz de separar los pacientes según la agresividad del tumor (429). Posteriormente, utilizamos el *Variable Importance in Projection* (VIP) *score* para evaluar el peso de cada variable en el modelo. La edad, los niveles de sTWEAK en semen, los niveles de PSA en suero, y los niveles de expresión de exomiRNA-221-3p, -222-3p y -31-5p en semen destacaron como las variables de mayor peso en el modelo (*Score* por encima de 1) (429). Como dato interesante, cabe mencionar que la expresión tanto del exomiRNA-221-3p como los niveles de

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

sTWEAK, ambos semen, fueron las variables con más peso en el modelo, con un VIP Score de 1,892 y 1,556 respectivamente, seguido del biomarcador clásico (PSA) (VIP Score de 1,534) (429). No es de extrañar que el semen sea el fluido que más información aporte en el modelo ya que el 40% del volumen seminal deriva del tejido prostático (72), por lo que el fluido seminal refleja con más fidelidad la patología tumoral que el suero o la orina.

Análisis estadísticos mediante regresiones logísticas binarias y la creación de curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC) permitieron estratificar mejor nuestros pacientes en función del grado de agresividad del tumor. Así, la mejor curva ROC era la que se generó con las variables exomiRNA-221-3p, -222-3p en semen y los niveles de sTWEAK en semen que, con un área bajo la curva (AUC) de 0,857, permiten el diagnóstico correcto de la agresividad del tumor del 87,5% de los pacientes. Este panel supera al PSA como predictor de agresividad en un 26,98% (AUC de 0,662 y diagnóstico correcto del 63,9% de los pacientes) (429).

El panel que integra la medición en el semen, como fluido informativo, de 2 exomiRNAs (exomiR-221-3p y -222-3p) y de los niveles de sTWEAK, podría ser de gran utilidad a nivel clínico para decidir si un tumor es agresivo o no (Figura 24). Cabe mencionar que nuestro grupo describió otro panel de biomarcadores para determinar la agresividad del CaP (185). Dicho panel estaba compuesto por los niveles sTWEAK en semen, la glucemia sérica en ayunas, los niveles séricos de PSA, y además incluía la medición, mediante RT-qPCR, de la expresión a nivel de ARNm en el sedimento celular del semen del receptor *FN14*, Kalikreina 2 (*KLK2*) que codifica la proteína que activa el PSA, el receptor beta de la IL-8 (*CXCR2*) y el receptor de quimiocinas C-C tipo 3 (*CCR3*) (185). Con este panel el porcentaje de diagnóstico de la agresividad del tumor era superior (90,9% frente al 87,5% que tiene el modelo del estudio actual) (185), pero la ventaja del nuevo panel de biomarcadores reside en que pasamos de medir 7 biomarcadores en 3 muestras biológicas diferentes (semen, suero y sedimento celular de semen) a medir 3 biomarcadores en una sola muestra biológica (semen). Todo ello representa no sólo un abaratamiento del coste y de tiempo invertido para su detección, sino que además se trata de un biofluido que no requiere ni métodos invasivos ni personal cualificado para su obtención.

Aunque el potencial de pronóstico del panel que aquí se presenta es muy prometedor, somos conscientes que el tamaño de nuestra cohorte es pequeño, por lo que será necesario validar los datos obtenidos en estudios poblacionales que incluyan cohortes de mayor tamaño muestral con el fin de corroborar nuestros hallazgos, y poder dar un paso adelante en su aplicación clínica de rutina, lo cual evitaría la realización de biopsias innecesarias y tratamientos radicales en pacientes con tumores indolentes. Finalmente, está pendiente de validar el uso de este panel en la vigilancia activa de pacientes con CaP indolente cómo nuevo enfoque en el contexto de la monitorización y tratamiento del CaP.

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Por lo que respecta a miR-221-3p y miR-222-3p, cabe destacar que son microRNAs que están codificados en tándem en el cromosoma X (431), y se pueden detectar o bien libres en biofluidos o encapsulados formando parte del cargo de las VEs. Ambos miRNAs en su forma libre se han postulado como biomarcadores en diferentes tumores, como cáncer de mama (432), gástrico (433) o glioblastoma (434) entre otros. Por lo que respecta al CaP, se ha descrito que los niveles de miR-221-3p libres en plasma permiten clasificar los tumores localizados de los metastásicos en una cohorte de pacientes norteafricanos (435). Por otro lado, los niveles de exomiRNAs en VEs, y particularmente los niveles de expresión del exomiR-222-3p en semen, se han detectado elevados tanto en pacientes con hiperplasia benigna como en pacientes con CaP al compararlos con un grupo control aunque las diferencias no eran significativas (369). Estos datos refuerzan nuestro estudio como pionero en la determinación de la agresividad del CaP mediante la utilización de exomiRNAs en semen (429).

In vitro, ambos miRNAs están sobre expresados en la línea andrógeno independiente PC-3, en comparación con la línea celulares andrógeno dependientes LNCaP y con la líneas epiteliales sanas 22Rv1 y RWPE-1 (431). En la línea celular PC-3, la expresión de exomiR-221-3p aumenta después de un estímulo con sTWEAK (429). Se ha descrito que la regulación epigenética del tándem formado por miR-221/222 está involucrada en el control del receptor de andrógenos (436). Además, el tándem miR-221-3p/miR-222-3p puede regular la expresión de la caspasa-10 y el inhibidor 1B de quinasas dependientes de ciclinas (p27^{Kip1}) (431,437), lo cual implica a este tándem en la progresión celular descontrolada e inhibición de la apoptosis celular; y del gen *Distinct Subgroup Of The Ras Family Member 3* (DIRAS3), posibilitando la transición epitelial-mesenquimal (438)

Con la finalidad de buscar nuevas dianas terapéuticas, se realizó una búsqueda en diferentes software de predicción para intentar encontrar genes diana del exomiR-221-3p mediante diferentes algoritmos: la puntuación mirSVR y PhastCons del software miRanda (www.microRNA.org), la puntuación miTG del software Diana-MicroT-CDS (https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/dianauniverse/index.php?r=miroT_CDS) y el algoritmo TarPmiR mediante la puntuación miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) del software del mismo nombre. Detectamos 10 genes que podrían ser dianas del exomiR-221-3p: el factor de transcripción 12 (TCF12), el gen de la proteína 23 asociada al sinaptosoma (SNAP23), dipeptidil peptidasa 8 (DPP8), *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear* (ARNT), *Nemo-like Kinase* (NLK), *Butyrate Response Factor 2* (EGF-Response Factor 2) (ZFP36L2), *Folliculin Interacting Protein 2* (FNIP2), el receptor de estrógeno alfa (ESR1), *Homeodomain-interacting protein kinase 1* (HIPK1) y el receptor *scavenger* de clase B de tipo 2 (SCARB2) (429). El análisis de la expresión génica de los 10 genes diana candidatos en la línea celular PC-3 nos permitió detectar que sólo la expresión de NLK y TCF12 disminuía después de estimular las células con sTWEAK (429).

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

NLK es una serina/treonina quinasa miembro de las MAPKs (439). Su expresión está alterada en diversos tumores y es crucial en procesos proliferativos, migratorios, invasivos y apoptóticos (439). En el contexto del CaP, se ha descrito que su expresión proteica esta disminuida en tumores metastásicos en comparación con epitelio sano y tumores de próstata encapsulado (440). Por otro lado, se ha descrito que NLK es un gen regulado por miR-221 en células de neuroblastoma (441). Por lo que respecta a TCF12, su expresión génica se ha relacionado en numerosos tumores tales como colon, carcinoma hepatocelular u ovario (442–444), vinculándola con procesos migratorios e invasivos (445). Sin embargo, hay solo un estudio en CaP que muestra la disminución de la expresión de TCF12 en relación con la progresión tumoral y postulado como predictor independiente de la recurrencia bioquímica (446). Interesantemente, se ha descrito la regulación de TCF12 por miR-221-3p y -222-3p en cáncer de colon y se ha demostrado su implicación en la vía de señalización del *Pigment epithelium-derived factor* (PEDF) (447), vía que regula procesos anti proliferativos, anti migratorios y anti apoptóticos. Se conoce que PEDF está disminuida en diversos tipos de cáncer, incluido el CaP (448,449).

Así pues, puesto que existen evidencias de la implicación tanto de NLK como de TCF12 en CaP, queríamos demostrar si dichos genes estaban además regulados por el efecto de sTWEAK sobre el exomiRNA-221-3p. Utilizamos para ello inhibidores de miR-221-3p y estimulamos las células con sTWEAK. Los resultados confirmaron la inhibición proteica de NLK y TCF12 al estimular las células con sTWEAK, tal como observamos en la expresión génica, en un 20% y 25% respectivamente (429). Por lo tanto, corroboramos que sTWEAK regula la expresión tanto génica como proteica de NLK y TCF12 en la línea celular PC-3. Por otro lado, no observamos cambios en la expresión proteica de NLK y TCF12 con la inhibición del miR-221-3p y estímulo posterior con sTWEAK respecto a las células tratadas con el control negativo del inhibidor del miR-221-3p (429). Este dato nos permite ratificar que el exomiR-221-3p regula la expresión de NLK y TCF12 en las células de la línea PC-3 y, a su vez, su expresión está regulada por la presencia de sTWEAK. Sin embargo, somos consciente que se requerirán más estudios en diferentes modelos celulares y animales con el fin de profundizar en la regulación de la expresión de NLK y TCF12 a través de la acción de TWEAK sobre miR-221-3p.

En conclusión, el presente estudio revela que los exomiRNAs regulados por sTWEAK (exomiR-221-3p y exomiR-222-3p) junto con los niveles en semen de sTWEAK constituyen un novedoso y eficaz panel de pronóstico de CaP basado en la información obtenida de una única biopsia líquida, el semen (Figura 24). Además, proponemos los genes NLK y TCF12 como posibles dianas terapéuticas para el CaP reguladas por el efecto de sTWEAK en el microambiente tumoral basadas en el uso de inhibidores del exomiR-221-3p.

Discusión

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

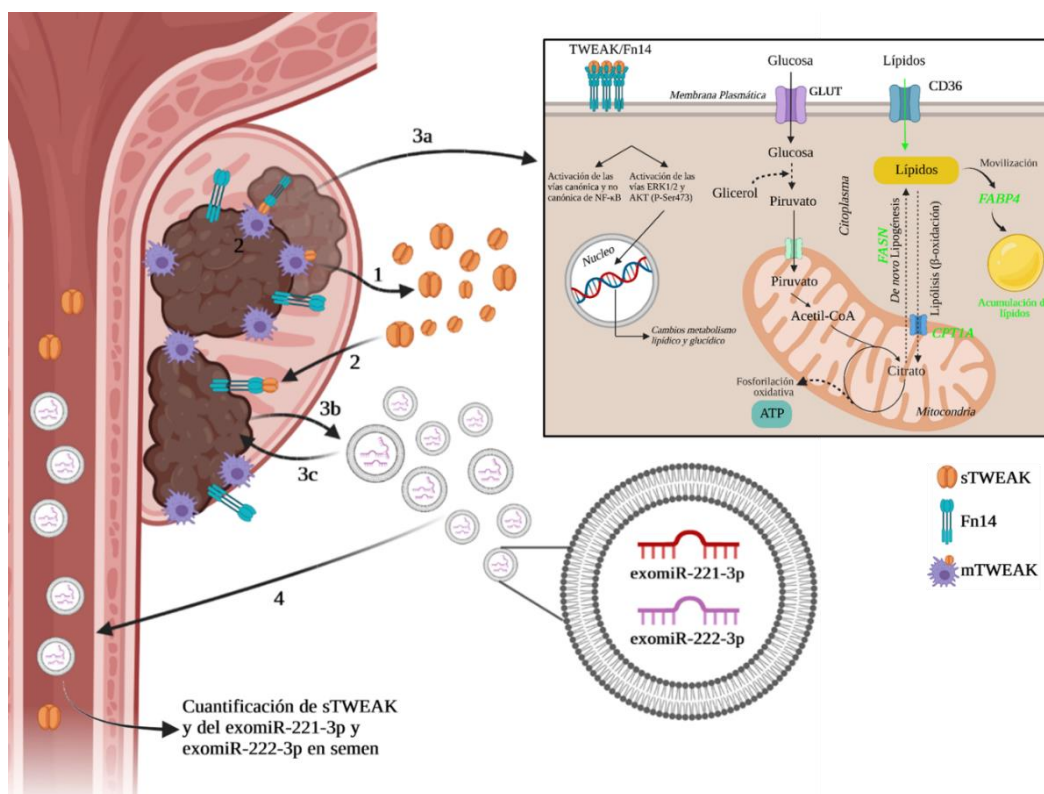


Figura 24 – Figura resumen del papel de TWEAK en el contexto del CaP. 1-TWEAK es sintetizado y expresado como mTWEAK en la superficie celular, y se libera al microambiente en forma soluble (sTWEAK) mediante la acción proteolítica de una furina. 2-Tanto sTWEAK como mTWEAK pueden unirse a su receptor bona fide, Fn14, activando una serie de vías de señalización provocando diferentes respuestas celulares. 3a- Puede fosforilar AKT (p-AKT en la serina 473) y ERK1/2 (p-ERK1/2), importantes reguladores metabólicos, y provocar cambios significativos en el metabolismo lipídico (aumento de la lipogénesis de novo y la lipólisis, la movilización y la entrada y acumulación de ácidos grasos en las células de próstata) mediante la regulación de la expresión de genes tales como FASN, CPT1A o FABP4, entre otros. 3b- A la vez, la unión del eje TWEAK/Fn14 puede provocar la secreción de VEs y modificar el cargo de exomiRNAs. 3c- Las vesículas extracelulares pueden ser interiorizadas por las células como mecanismo de comunicación autocrino y paracrino, influyendo en la expresión génica de diversos genes diana de los exomiRNAs (NLK y TCF12). 4- Además, tanto las VEs como sTWEAK pueden llegar a la circulación por la uretra y ser detectados en biofluidos, tales como el semen y la orina. Observamos que los niveles de expresión del exomiRNA-221-3p, -222-3p están aumentados en el semen de los pacientes de Alto Riesgo y los niveles de sTWEAK en semen estaban disminuidos en los pacientes de Alto Riesgo. El panel formado por la expresión relativa del exomiR-221-3p, exomiR-222-3p y los niveles de sTWEAK en semen pueden predecir la agresividad del tumor prostático. Creado con Biorender. **Abreviaciones:** AKT, Proteína Quinasa B; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; FASN, ácido graso sintasa; CPT1A, carnitina palmitoiltransferasa 1 A; FABP4, proteína de unión a ácidos grasos 4.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- Los niveles séricos de sTWEAK se encuentran disminuidos en los pacientes con CaP respecto a pacientes control sanos y pueden ser útiles como biomarcador de diagnóstico de CaP puesto que, junto con niveles elevados del PSA e índice HOMA-IR y niveles disminuidos de HDL, son predictores independientes de CaP.
- La presencia de sTWEAK en el microambiente de CaP potencia el metabolismo lipídico, pero no el glucídico, e indirectamente la agresividad del tumor en la línea celular PC-3, regulando la expresión génica y proteica de genes clave de la entrada de lípidos en la mitocondria para su oxidación (*CPT1A*), la movilización celular de lípidos (*FABP4*) y en la lipogénesis *de novo* (*FASN*), entre otros.
- Los efectos metabólicos ejercidos por sTWEAK sobre la línea celular PC-3 se efectúan través de su receptor *bona fide* Fn14, puesto que la inhibición de su expresión reduce el efecto potenciador observado sobre el metabolismo lipídico.
- La interacción de TWEAK con su receptor induce la captación de ácidos grasos y su acumulación en la línea celular PC-3.
- La fosforilación de las vías de ERK1/2 y AKT (ser473) son necesarias para ejercer los efectos metabólicos TWEAK en las células de CaP.
- La presencia de sTWEAK en el microambiente de CaP induce la secreción de VES y modifica el cargo de exomiRNAs en líneas celulares prostáticas.
- Tres exomiRNAs regulados por sTWEAK se encuentran aumentados en semen de pacientes de Alto Riesgo comparado con pacientes de Bajo Riesgo (exomiR-221-3p, -222-3p y -31-5p), mientras que dos exomiRNAs están disminuidos en orina en los pacientes de Alto Riesgo (exomiR-193b-3p y -423-5p).
- La detección en semen del panel de biomarcadores compuesto por los exomiRNAs exomiR-221-3p y exomiR-222-3p y los niveles de sTWEAK, mejora significativamente el pronóstico de la agresividad del tumor.
- sTWEAK modula la expresión de los genes NLK y TCF12, implicados en la progresión del CaP, a través del exomiR-221-3p, lo que podría abrir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del CaP.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Martini F, Timmons M, Tallitsch R, Ober W, Garrison C, Welch K, et al. Human Anatomy. Hum Anat. 7th ed. 2012;139–79.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209–49.
3. Litwin MS, Tan HJ. The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. JAMA - J Am Med Assoc. 2017;317(24):2532–42.
4. Chinaranagari S, Sharma P, Bowen NJ, Chaudhary J. Prostate Cancer Epigenome. Methods Mol Biol. 2015;1238:125–40.
5. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, et al. Prostate cancer. Nat Rev Dis Prim. 2021;7(9):1–27.
6. Pugliese D, Palermo G, Totaro A, Bassi PF, Pinto F. Clinical, Pathological and Molecular Prognostic Factors in Prostate Cancer Decision-Making Process. Urol J. 2016 Jan 1;83(1):14–20.
7. Thompson IM. PSA: A Biomarker for Disease. A Biomarker for Clinical Trials. How Useful Is It? J Nutr. 2006;136:2704S.
8. Bickers B, Aukim-Hastie C. New Molecular Biomarkers for the Prognosis and Management of Prostate Cancer – The Post PSA Era. Anticancer Res. 2009;3289–98.
9. Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T. Some physico-chemical characteristics of “Gamma-seminoprotein”, an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. Japanese J Leg Med. 1971 Jul;25(4):322–4.
10. Kuriyama M, Wang MC, Papsidero LD, Killian CS, Shimano T, Valenzuela L, et al. Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay. Cancer Res. 1980 Dec;40(12):4658–62.
11. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. Cancer Res. 1980 Jul;40(7):2428–32.
12. Filella X, Foj L. Prostate cancer detection and prognosis: From prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. Int J Mol Sci. 2016;17(11):1784.
13. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. N Engl J Med. 2004 May;350(22):2239–46.
14. Adhyam M, Gupta AK. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. Indian J Surg Oncol. 2012 Jun;3(2):120–9.
15. Ruckle HC, Klee GG, Oesterling JE. Prostate-Specific Antigen: Critical Issues for the Practicing Physician. Mayo Clin Proc. 1994 Jan 1;69(1):59–68.
16. Turo R, Forster JA, West RM, Prescott S, Paul AB, Cross WR. Do prostate cancer nomograms give accurate information when applied to European patients? Scand J Urol. 2015 Jan 2;49(1):16–24.
17. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Witterkind C. TNM Classification of Malignant Tumours. 8th ed. Union for International Cancer Control. 2016. 1–272 p.
18. Harnden P, Shelley MD, Coles B, Staffurth J, Mason MD. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol. 2007 May 1;8(5):411–9.
19. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. 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. 2016;40(2):244–52.
20. D’Amico A V, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. JAMA. 1998 Sep;280(11):969–74.
21. Muniyan S, Chaturvedi NK, Dwyer JG, LaGrange CA, Chaney WG, Lin MF. Human prostatic acid

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- phosphatase: Structure, function and regulation. *Int J Mol Sci.* 2013 May;14(5):10438–64.
22. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, et al. Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer. *Neoplasia.* 2008;10(2):177–88.
 23. Jones W, Griffiths K, Barata PC, Paller CJ. PSMA Theranostics: Review of the Current Status of PSMA-Targeted Imaging and Radioligand Therapy. *Cancers (Basel).* 2020;12:1367.
 24. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, et al. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene.* 2000;19:1288–96.
 25. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 2002 Oct 10;419(6907):624–9.
 26. Marks LS, Fradet Y, Lim Deras I, Blase A, Mathis J, Aubin SMJ, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology.* 2007 Mar;69(3):532–5.
 27. Ferreira LB, Palumbo A, de Mello KD, Sternberg C, Caetano MS, de Oliveira FL, et al. PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer.* 2012 Nov 6;12:507.
 28. Culig Z, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Nov 29;197(1–2):231–8.
 29. Wikström P, Bergh A, Damber J. Transforming growth factor-beta1 and prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol.* 2000;34(2):85–94.
 30. Olson A, Le V, Aldahl J, Yu E-J, Hooker E, He Y, et al. The comprehensive role of E-cadherin in maintaining prostatic epithelial integrity during oncogenic transformation and tumor progression. *PLOS Genet.* 2019;15(10):e1008451.
 31. Orellana-Serradell O, Herrera D, Castellon E, Contreras H. The transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. *Asian J Androl.* 2018 May 1;20(3):294–9.
 32. Galletti G, Portella L, Tagawa ST, Kirby BJ, Giannakakou P, Nanus DM. Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer Diagnosis and Monitoring: An Appraisal of Clinical Potential. *Mol Diagnosis Ther* 2014 184. 2014 May 9;18(4):389–402.
 33. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. *N Engl J Med.* 1987;317(15):909–16.
 34. Amaro A, Esposito AI, Gallina A, Nees M, Angelini G, Albini A, et al. Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: A long road to travel. *Cancer Metastasis Rev.* 2014;33(2–3):657–71.
 35. Kruk J, Aboul-Enein HY. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Carcinogenesis: Implications of Oxidative Stress on the Progression and Development of Several Cancer Types. *Mini Rev Med Chem.* 2017;17(11):904–19.
 36. Cuzick J, Swanson GP, Fisher G, Brothman AR, Berney DM, Reid JE, et al. Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: A retrospective study. *Lancet Oncol.* 2011;12(3):245–55.
 37. Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, Reid JE, Djalilvand A, Bhatnagar S, et al. Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *J Clin Oncol.* 2013 Apr;31(11):1428–34.
 38. Klein EA, Cooperberg MR, Magi-Galluzzi C, Simko JP, Falzarano SM, Maddala T, et al. A 17-gene Assay to Predict Prostate Cancer Aggressiveness in the Context of Gleason Grade Heterogeneity, Tumor Multifocality, and Biopsy Undersampling. *Eur Urol.* 2014;66(3):550–60.
 39. Cullen J, Rosner IL, Brand TC, Zhang N, Tsiatis AC, Moncur J, et al. A biopsy-based 17-gene genomic prostate score predicts recurrence after radical prostatectomy and adverse surgical pathology in a racially diverse population of men with clinically low- and intermediate-risk prostate cancer. *Eur Urol.* 2015;68(1):123–31.
 40. Parker C, Castro E, Fizazi K, Heidenreich A, Ost P, Procopio G. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020;31(9):1119–34.
 41. Michaelson MD, Cotter SE, Gargollo PC, Zietman AL, Dahl DM, Smith MR. Management of Complications of Prostate Cancer Treatment. *CA Cancer J Clin.* 2008 Jul 1;58(4):196–213.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

42. Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B. Androgen deprivation therapy: Progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol*. 2009;6(2):76–85.
43. Cunningham D, You Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol methods*. 2015 Jun 4;2(1):e17.
44. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*. 1979 Jul;17(1):16–23.
45. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Res*. 1983;43(43):1809–18.
46. Bello D, Webber MM, Kleinman HK, Wartinger DD, Rhim JS. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis*. 1997 Jun;18(6):1215–23.
47. Bono JS de, Guo C, Gurel B, Marzo AM De, Sfanos KS, Mani RS, et al. Prostate carcinogenesis: inflammatory storms. *Nat Rev Cancer* 2020 208. 2020 Jun 16;20(8):455–69.
48. Trinchieri G. Innate inflammation and cancer: Is it time for cancer prevention? *F1000 Med Rep*. 2011 Jun 1;3(11).
49. Gurel B, Lucia MS, Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Kristal AR, et al. Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 May 1;23(5):847–56.
50. Dahl HC, Kanchwala M, Thomas-jardin SE, Sandhu A, Id EF, Id NAD. Chronic IL-1 exposure drives LNCaP cells to evolve androgen and AR independence. *PLoS One*. 2020;15(12):1–25.
51. Pencik J, Wiebringhaus R, Susani M, Culig Z, Kenner L. IL-6/STAT3/ARF : the guardians of senescence, cancer progression and metastasis in prostate cancer. *Swiss Med Wkly*. 2015;6(December):1–10.
52. Rojas A, Liu G, Coleman I, Nelson PS, Zhang M, Dash R, et al. IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. *Oncogene*. 2011;30:2345–55.
53. Guo Y, Zang Y, Lv L, Cai F. IL-8 promotes proliferation and inhibition of apoptosis via STAT3/AKT/NF- κ B pathway in prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2017;16(24):9035–42.
54. Liu B, Xu M, Guo Z, Liu J, Chu XU, Jiang H. Interleukin-8 promotes prostate cancer bone metastasis through upregulation of bone sialoprotein. *Oncol Lett*. 2019;17:4607–13.
55. Wang M, Liu X, Chen Z, Chen H, Tan Y. Metformin suppressed tumor necrosis factor- α -induced epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer by inactivating the NF- κ B signaling pathway. *Transl Cancer Res*. 2020;9(1):6086–95.
56. Bader DA, McGuire SE. Tumour metabolism and its unique properties in prostate adenocarcinoma. *Nat Rev Urol*. 2020;17(4):214–31.
57. Ahmad F, Cherukuri MK, Choyke PL. Metabolic reprogramming in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2021;125(9):1185–96.
58. Briukhovetska D, Dörr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(8):481–99.
59. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* (80-). 1956 Feb 24;123(3191):309–14.
60. Zadra G, Photopoulos C, Loda M. The fat side of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831(10):1518–32.
61. Gazi E, Gardner P, Lockyer NP, Hart CA, Brown MD, Clarke NW. Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *J Lipid Res*. 2007;48(8):1846–56.
62. Watt MJ, Clark AK, Selth LA, Haynes VR, Lister N, Rebello R, et al. Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2019;11(478).
63. Liu RZ, Godbout R. An amplified fatty acid-binding protein gene cluster in prostate cancer: Emerging roles in lipid metabolism and metastasis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):1–19.
64. Elix C, Pal SK, Jones JO. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2019;20(June):238–43.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

65. Spick C, Herrmann K, Czernin J. Evaluation of Prostate Cancer with ¹¹C-Acetate PET/CT. *J Nucl Med.* 2016 Oct 1;57(Supplement 3):30S-37S.
66. Aggarwal R, Vigneron DB, Kurhanewicz J. Hyperpolarized 1-[(13)C]-Pyruvate Magnetic Resonance Imaging Detects an Early Metabolic Response to Androgen Ablation Therapy in Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017 Dec;72(6):1028–9.
67. Luo X, Cheng C, Tan Z, Li N, Tang M, Yang L, et al. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Mol Cancer.* 2017;16(76).
68. Jayakumar A, Tai M, Huang W, Al-feel W, Hsu M. Human fatty acid synthase : Properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(September):8695–9.
69. Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of Neoplastic Tissue. IV. A Study of Lipid Synthesis in Neoplastic Tissue Slices in Vitro. *Cancer Res.* 1953;13(1):27–9.
70. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese R V. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab.* 2013;18(2):153–61.
71. Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, et al. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res.* 2003;1(10):707–15.
72. Liu ZL, Wang G, Peng AF, Luo QF, Zhou Y, Huang SH. Fatty acid synthase expression in osteosarcoma and its correlation with pulmonary metastasis. *Oncol Lett.* 2012;4(5):878–82.
73. Fiorentino M, Zadra G, Palescandolo E, Fedele G, Bailey D, Fiore C, et al. Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of β -catenin in prostate cancer. *Lab Invest.* 2008;88(12):1340–8.
74. Van de Sande T, Roskams T, Lerut E, Joniau S, Van Poppel H, Verhoeven G, et al. High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol.* 2005;206(2):214–9.
75. Guo D, Bell EH, Mischel P, Chakravarti A. Targeting SREBP-1-driven lipid metabolism to treat cancer. *Curr Pharm Des.* 2014;20(15):2619–26.
76. Huang WC, Li X, Liu J, Lin J, Chung LWK. Activation of androgen receptor, lipogenesis, and oxidative stress converged by SREBP-1 is responsible for regulating growth and progression of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2012;10(1):133–42.
77. Ettinger SL, Sobel R, Whitmore TG, Akbari M, Bradley DR, Gleave ME, et al. Dysregulation of Sterol Response Element-Binding Proteins and Downstream Effectors in Prostate Cancer during Progression to Androgen Independence. *Cancer Res.* 2004;64(1):2212–21.
78. Centenera MM, Scott JS, Machiels J, Nassar ZD, Miller DC, Zinonos I, et al. ELOVL5 is a critical and targetable fatty acid elongase in prostate cancer. *Cancer Res.* 2021;81(7):1704–18.
79. Tamura K, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kobayashi T, Furihata M, Chung S, et al. Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res.* 2009;69(20):8133–40.
80. Mamouni K, Kallifatidis G, Lokeshwar BL. Targeting mitochondrial metabolism in prostate cancer with triterpenoids. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):1–15.
81. Yi J, Zhu J, Wu J, Thompson CB, Jiang X. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(49):31189–97.
82. Li M, Xian H chun, Tang YJ, Liang X hua, Tang Y ling. Fatty acid oxidation: driver of lymph node metastasis. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):1–13.
83. Liu R-Z, Choi W-S, Jain S, Dinakaran D, Xu X, Han WH, et al. The FABP12/PPAR γ pathway promotes metastatic transformation by inducing epithelial-to-mesenchymal transition and lipid-derived energy production in prostate cancer cells. *Mol Oncol.* 2020;14(12):3100–20.
84. Nomura DK, Lombardi DP, Chang JW, Niessen S, Ward AM, Long JZ, et al. Monoacylglycerol lipase exerts dual control over endocannabinoid and fatty acid pathways to support prostate cancer. *Chem Biol.* 2011 Jul 29;18(7):846.
85. Zha S, Ferdinandusse S, Hicks JL, Denis S, Dunn TA, Wanders RJ, et al. Peroxisomal branched chain fatty acid beta-oxidation pathway is upregulated in prostate cancer. *Prostate.* 2005 Jun 1;63(4):316–23.
86. Liu Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic*

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- Dis. 2006 Sep;9(3):230–4.
87. Schlaepfer IR, Rider L, Rodrigues LU, Gijón MA, Pac CT, Romero L, et al. Lipid catabolism via CPT1 as a therapeutic target for prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(10):2361–71.
 88. Margel D, Urbach D, Lipscombe LL, Bell CM, Kulkarni G, Austin PC, et al. Association between metformin use and risk of prostate cancer and its grade. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Aug 7;105(15):1123–31.
 89. Zadra G, Ribeiro CF, Chetta P, Ho Y, Cacciatore S, Gao X, et al. Inhibition of de novo lipogenesis targets androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jan 8;116(2):631–40.
 90. Li X, Chen YT, Hu P, Huang WC. Fatostatin displays high antitumor activity in prostate cancer by blocking SREBP-regulated metabolic pathways and androgen receptor signaling. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(4):855–66.
 91. Zadra G, Photopoulos C, Tyekucheva S, Heidari P, Weng QP, Fedele G, et al. A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO Mol Med.* 2014;6(4):519–38.
 92. Wajant H. The TWEAK-Fn14 system as a potential drug target. *Br J Pharmacol.* 2013;170(4):748–64.
 93. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci.* 2002 Jan 1;27(1):19–26.
 94. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu Y-M, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a New Secreted Ligand in the Tumor Necrosis Factor Family That Weakly Induces Apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32401–10.
 95. Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The “complexities” of life and death: Death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res.* 2012 Jul 1;318(11):1269–77.
 96. O’Shea JJ, Gadina M, Siegel R. Cytokines and cytokine receptors. *Clin Immunol Princ Pract Fourth Ed. Fifth Edit.* 2012;1:108–35.
 97. Maymó-Masip E, Fernández-Veledo S, García España A, Vázquez-Carballo A, Tinahones FJ, García-Fuentes E, et al. The Rise of Soluble TWEAK Levels in Severely Obese Subjects After Bariatric Surgery May Affect Adipocyte-Cytokine Production Induced by TNF). *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;(8):98.
 98. Baxter FO, Came PJ, Abell K, Kedjouar B, Huth M, Rajewsky K, et al. IKK β /2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Dev Dis.* 2006;133(17):3485–94.
 99. Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles JA, Lindner V, et al. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity.* 2001;15(5):837–46.
 100. Meighan-Mantha RL, Hsu DKW, Guo Y, Brown SAN, Feng SLY, Peifley KA, et al. The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *J Biol Chem.* 1999;274(46):33166–76.
 101. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: Discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 May;7(5):411–25.
 102. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Jun 1;14(3–4):241–9.
 103. Chopard C, Hohl D, Huber M. The role of the TRAF-interacting protein in proliferation and differentiation. *Exp Dermatol.* 2012 May;21(5):321–6.
 104. Zhang C, Gao F, Teng F, Zhang M. Fas/FasL Complex Promotes Proliferation and Migration of Brain Endothelial Cells Via FADD–FLIP–TRAF–NF- κ B Pathway. *Cell Biochem Biophys.* 2015 Apr 1;71(3):1319–23.
 105. Sharif MN, Campanholle G, Nagiec EE, Wang J, Syed J, O’Neil SP, et al. Soluble Fn14 is detected and elevated in mouse and human kidney disease. *PLoS One.* 2016 May 1;11(5).
 106. Cheng E, Armstrong CL, Galisteo R, Winkles JA. TWEAK/Fn14 axis-targeted therapeutics: Moving basic science discoveries to the clinic. *Front Immunol.* 2013;4(DEC).
 107. Gurunathan S, Winkles JA, Ghosh S, Hayden MS. Regulation of fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) expression levels via ligand-independent lysosomal degradation. *J Biol Chem.* 2014;289(19):12976–88.
 108. Huang M, Narita S, Tsuchiya N, Ma Z, Numakura K, Obara T, et al. Overexpression of Fn14 promotes

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- androgen-independent prostate cancer progression through MMP-9 and correlates with poor treatment outcome. *Carcinogenesis*. 2011 Nov;32(11):1589–96.
109. Watts GS, Tran NL, Berens ME, Bhattacharyya AK, Nelson MA, Montgomery EA, et al. Identification of Fn14/TWEAK receptor as a potential therapeutic target in esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2007 Nov 15;121(10):2132–9.
 110. Kwon OH, Park SJ, Kang TW, Kim M, Kim JH, Noh SM, et al. Elevated fibroblast growth factor-inducible 14 expression promotes gastric cancer growth via nuclear factor- κ B and is associated with poor patient outcome. *Cancer Lett*. 2012 Jan 1;314(1):73–81.
 111. Sun Y, Han Y, Wang X, Wang W, Wang X, Wen M, et al. Correlation of EGFR Del 19 with Fn14/JAK/STAT signaling molecules in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2016 Aug 1;36(2):1030–40.
 112. Li N, Hu WJ, Shi J, Xue J, Guo WX, Zhang Y, et al. Roles of fibroblast growth factor-inducible 14 in hepatocellular carcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2013;14(6):3509–14.
 113. Burkly LC, Michaelson JS, Zheng TS. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev*. 2011 Nov;244(1):99–114.
 114. Bover LC, Cardó-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, Takeya M, et al. A Previously Unrecognized Protein-Protein Interaction between TWEAK and CD163: Potential Biological Implications. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):8183–94.
 115. Moreno JA, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Orbe J, Páramo JA, et al. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK. Potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009 Nov;207(1):103–10.
 116. Møller HJ, Holger JM, Ller HJMØ. Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012;163(1):1–13.
 117. Barke TL, Goldstein JA, Sundermann AC, Reddy AP, Linder JE, Correa H, et al. Gestational diabetes mellitus is associated with increased CD163 expression and iron storage in the placenta. *Am J Reprod Immunol*. 2018 Oct 1;80(4).
 118. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med*. 2011 Dec 16;9(216).
 119. Llauradó G, González-Clemente JM, Maymó-Masip E, Subías D, Vendrell J, Chacón MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: Relationship with cardiovascular risk factors. A case-control study. *PLoS One*. 2012 Aug 24;7(8).
 120. Sporrer D, Weber M, Wanninger J, Weigert J, Neumeier M, Stögbauer F, et al. Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity. *Eur J Clin Invest*. 2009 Aug;39(8):671–9.
 121. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Høyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American joint committee on cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 10;27(20):3330–7.
 122. Walter RB, Bächli EB, Schaer DJ, Rüegg R, Schoedon G. Expression of the hemoglobin scavenger receptor (CD163/HbSR) as immunophenotypic marker of monocytic lineage in acute myeloid leukemia [5]. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3755–6.
 123. Bächli EB, Schaer DJ, Walter RB, Fehr J, Schoedon G. Functional expression of the CD163 scavenger receptor on acute myeloid leukemia cells of monocytic lineage. *J Leukoc Biol*. 2006 Feb;79(2):312–8.
 124. Maniecki MB, Hasle H, Friis-Hansen L, Lausen B, Nielsen OJ, Bendix K, et al. Impaired CD163-mediated hemoglobin-scavenging and severe toxic symptoms in patients treated with gemtuzumab ozogamicin. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1510–4.
 125. Enwere EK, LaCasse EC, Adam NJ, Korneluk RG. Role of the TWEAK-Fn14-cIAP1-NF- κ B signaling axis in the regulation of myogenesis and muscle homeostasis. *Front Immunol*. 2014 Feb 5;5(FEB):34.
 126. Brown SAN, Ghosh A, Winkles JA. Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17432–41.
 127. Hinz M, Stilmann M, Arslan SÇ, Khanna KK, Dittmar G, Scheidereit C. A cytoplasmic ATM-TRAF6-cIAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF- κ B activation. *Mol Cell*. 2010 Oct 8;40(1):63–74.
 128. Shih VFS, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):86–102.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

129. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):227–41.
130. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of IκBα by a novel ubiquitination- dependent protein kinase activity. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):853–62.
131. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853–66.
132. Arbab IA, Looi CY, Abdul AB, Cheah FK, Wong WF, Sukari MA, et al. Dentatin induces apoptosis in prostate cancer cells via Bcl-2, Bcl-xL, Survivin downregulation, caspase-9, -3/7 activation, and NF-κB inhibition. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012;2012:15.
133. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-κB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*. 2001 Jul 12;20(31):4188–97.
134. Jin R, Sterling JA, Edwards JR, DeGraff DJ, Lee C, Park SI, et al. Activation of NF-kappa B Signaling Promotes Growth of Prostate Cancer Cells in Bone. Wang QJ, editor. *PLoS One*. 2013 Apr 5;8(4).
135. Tegowski M, Baldwin A. Noncanonical NF-κB in cancer. *Biomedicines*. 2018;6(2):1–21.
136. Nadiminty N, Lou W, Sun M, Chen J, Yue J, Kung HJ, et al. Aberrant activation of the androgen receptor by NF-κB2/p52 in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2010 Apr 15;70(8):3309–19.
137. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011 Sep 1;1813(9):1619–33.
138. Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2007 Aug 1;1773(8):1376–87.
139. Niault TS, Baccarini M. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2010 Jan 4;31(7):1165–74.
140. Yao Z, Seger R. The ERK signaling cascade-Views from different subcellular compartments. *BioFactors*. 2009 Sep 1;35(5):407–16.
141. Hu S, Xie Z, Onishi A, Yu X, Jiang L, Lin J, et al. Profiling the Human Protein-DNA Interactome Reveals ERK2 as a Transcriptional Repressor of Interferon Signaling. *Cell*. 2009 Oct 30;139(3):610–22.
142. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3279–90.
143. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2007 Aug 1;1773(8):1263–84.
144. Junttila MR, Li S, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. 2008 Apr 26;22(4):954–65.
145. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005;15(1):11–8.
146. Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA. p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med*. 2009 Aug 1;15(8):369–79.
147. Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: Cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci*. 2009;5(1):44–52.
148. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2010 Apr 1;1802(4):396–405.
149. Liu Z, Cao W. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase: A Critical Node Linking Insulin Resistance and Cardiovascular Diseases in Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets*. 2009 Mar 1;9(1):38–46.
150. Uzgare AR, Kaplan PJ, Greenberg NM. Differential expression and/or activation of p38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate*. 2003 May 1;55(2):128–39.
151. Yan Y, Huang H. Interplay Among PI3K/AKT, PTEN/FOXO and AR Signaling in Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1210:319–31.
152. Revathidevi S, Munirajan AK. Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol*. 2019;59:80–91.
153. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- 2009;4(1):127–50.
154. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandralapaty S, et al. Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cancer Cell*. 2011;19(5):575–86.
 155. Ikner A, Ashkenazi A. TWEAK induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIP1), Fas-associated Death Domain (FADD), and caspase-8. *J Biol Chem*. 2011 Jun 17;286(24):21546–54.
 156. Justo P, Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Winkles JA, Lorz C, Egido J, et al. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: The role of TWEAK. *Kidney Int*. 2006 Nov 27;70(10):1750–8.
 157. Schneider P, Schwenzer R, Haas E, Mühlenbeck F, Schubert G, Scheurich P, et al. TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. *Eur J Immunol*. 1999;29(6):1785–92.
 158. Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WWL, Hawkins CJ, Schneider P, et al. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNF α . *J Cell Biol*. 2008 Jul 14;182(1):171–84.
 159. Wang D, Fung JNT, Tuo Y, Hu L, Chen C. TWEAK/Fn14 promotes apoptosis of human endometrial cancer cells via caspase pathway. *Cancer Lett*. 2010;294(1):91–100.
 160. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Carrasco S, Manzarbeitia F, Ruiz-Andres O, Selgas R, et al. Inflammatory Cytokines and Survival Factors from Serum Modulate Tweak-Induced Apoptosis in PC-3 Prostate Cancer Cells. *PLoS One*. 2012 Oct 15;7(10).
 161. Sanz AB, Aroeira LS, Bellon T, Del Peso G, Jimenez-Heffernan J, Santamaria B, et al. TWEAK promotes peritoneal inflammation. *PLoS One*. 2014 Mar 5;9(3).
 162. Liu Q, Xiao S, Xia Y. TWEAK/Fn14 Activation Participates in Skin Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:6746870.
 163. Iocca HA, Plant SR, Wang Y, Runkel L, O'Connor BP, Lundsmith ET, et al. TNF superfamily member TWEAK exacerbates inflammation and demyelination in the cuprizone-induced model. *J Neuroimmunol*. 2008 Feb;194(1–2):97–106.
 164. Hu G, Zeng W, Xia Y. TWEAK/Fn14 signaling in tumors. *Tumor Biol*. 2017 Jan 1;39(6):1–9.
 165. Wang A, Zhang F, Xu H, Xu M, Cao Y, Wang C, et al. TWEAK/Fn14 promotes pro-inflammatory cytokine secretion in hepatic stellate cells via NF- κ B/STAT3 pathways. *Mol Immunol*. 2017 Jul 1;87:67–75.
 166. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, et al. TWEAK Activates the Non-Canonical NF κ B Pathway in Murine Renal Tubular Cells: Modulation of CCL21. Tailleux L, editor. *PLoS One*. 2010 Jan 29;5(1).
 167. Tiller G, Fischer-Posovszky P, Laumen H, Finck A, Skurk T, Keuper M, et al. Effects of TWEAK (TNF Superfamily Member 12) on Differentiation, Metabolism, and Secretory Function of Human Primary Preadipocytes and Adipocytes. *Endocrinology*. 2009 Dec 1;150(12):5373–83.
 168. Zhu C, Zhang L, Liu Z, Li C, Bai Y. TWEAK/Fn14 interaction induces proliferation and migration in human airway smooth muscle cells via activating the NF- κ B pathway. *J Cell Biochem*. 2018 Apr 11;119(4):3528–36.
 169. Schölzke MN, Röttinger A, Murikinati S, Gehrig N, Leib C, Schwaninger M. TWEAK regulates proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2011 Jan;46(1):325–32.
 170. Cheng H, Zhan N, Ding D, Liu X, Zou X, Li K, et al. HPV Type 16 Infection Switches Keratinocytes from Apoptotic to Proliferative Fate under TWEAK/Fn14 Interaction. *J Invest Dermatol*. 2015 Oct 14;135(10):2427–36.
 171. Kawakita T, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Saitou Y, Enokimura N, et al. Functional expression of TWEAK in human hepatocellular carcinoma: Possible implication in cell proliferation and tumor angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jun 4;318(3):726–33.
 172. Zhang F, Xu M, Yin X, Guo H, Zhang B, Wang Y, et al. TWEAK promotes hepatic stellate cell migration through activating EGFR/Src and PI3K/AKT pathways. *Cell Biol Int*. 2020 Jan 1;44(1):278–85.
 173. Sequera C, Vázquez-Carballo A, Arechederra M, Fernández-Veledo S, Porras A. TWEAK promotes migration and invasion in MEFs through a mechanism dependent on ERKs activation and Fibulin 3 down-regulation. *J Cell Physiol*. 2018 Feb 1;233(2):968–78.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

174. Tran NL, McDonough WS, Donohue PJ, Winkles JA, Berens TJ, Ross KR, et al. The human Fn14 receptor gene is up-regulated in migrating glioma cells in vitro and overexpressed in advanced glial tumors. *Am J Pathol.* 2003 Apr 1;162(4):1313–21.
175. Dai L, Gu L, Ding C, Qiu L, Di W. TWEAK promotes ovarian cancer cell metastasis via NF- κ B pathway activation and VEGF expression. *Cancer Lett.* 2009 Oct 8;283(2):159–67.
176. Hu G, Liang L, Liu Y, Liu J, Tan X, Xu M, et al. TWEAK/Fn14 Interaction Confers Aggressive Properties to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2019 Apr 1;139(4):796–806.
177. Armstrong CL, Galisteo R, Brown SAN, Winkles JA. TWEAK activation of the non-canonical NF- κ B signaling pathway differentially regulates melanoma and prostate cancer cell invasion. *Oncotarget.* 2016 Nov 3;7(49):81474–92.
178. Jakubowski A, Browning B, Lukashov M, Sizing I, Thompson JS, Benjamin CD, et al. Dual role for TWEAK in angiogenic regulation. *J Cell Sci.* 2002;115(2):267–74.
179. Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, Wiley SR. TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999 Mar 26;274(13):8455–9.
180. Ameri H, Liu H, Liu R, Ha Y, Paulucci-Holthausen AA, Hu S, et al. TWEAK/Fn14 pathway is a novel mediator of retinal neovascularization. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Jan 9;55(2):801–13.
181. Shimada K, Fujii T, Tsujikawa K, Anai S, Fujimoto K, Konishi N. ALKBH3 contributes to survival and angiogenesis of human urothelial carcinoma cells through NADPH oxidase and Tweak/Fn14/VEGF signals. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 1;18(19):5247–55.
182. Michaelson JS, Amatucci A, Kelly R, Su L, Garber E, Day ES, et al. Development of an Fn14 agonistic antibody as an anti-tumor agent. *MAbs.* 2011 Jul 27;3(4):362–75.
183. Trebing J, Lang I, Chopra M, Salzmann S, Moshir M, Silence K, et al. A novel llama antibody targeting Fn14 exhibits anti-metastatic activity in vivo. *MAbs.* 2014 Jan 7;6(1):297–308.
184. Aronin A, Amsili S, Prigozhina TB, Tzdaka K, Rachmilewitz J, Shani N, et al. Fn14•Trail Effectively Inhibits Hepatocellular Carcinoma Growth. Takehara T, editor. *PLoS One.* 2013 Oct 10;8(10).
185. Ruiz-Plazas X, Rodríguez-Gallego E, Alves M, Altuna-Coy A, Lozano-Bartolomé J, Portero-Otin M, et al. Biofluid quantification of TWEAK/Fn14 axis in combination with a selected biomarker panel improves assessment of prostate cancer aggressiveness. *J Transl Med.* 2019;17(1):1–13.
186. Chorianopoulos E, Jarr K, Steen H, Giannitsis E, Frey N, Katus HA. Soluble TWEAK is markedly upregulated in patients with ST-elevation myocardial infarction and related to an adverse short-term outcome. *Atherosclerosis.* 2010;211:322–6.
187. Moreno JA, Dejouvencel T, Labreuche J, Smadja DM, Dussiot M, Martin-Ventura JL, et al. Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jun 1;30(6):1253–62.
188. Chorianopoulos E, Rosenberg M, Zugck C, Wolf J, Katus HA, Frey N. Decreased soluble TWEAK levels predict an adverse prognosis in patients with chronic stable heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2009 Nov 1;11(11):1050–6.
189. Díaz-López A, Chacón MR, Bulló M, Maymó-Masip E, Martínez-González MA, Estruch R, et al. Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: A nested case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(8):3482–90.
190. Martín-Ventura JL, Lindholt JS, Moreno JA, Vega de Céniga M, Meilhac O, Michel JB, et al. Soluble TWEAK plasma levels predict expansion of human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 2011 Feb 1;214(2):486–9.
191. Lozano-Bartolomé J, Llauradó G, Rodríguez MM, Fernández-Real JM, García-Fontgüivell JF, Puig J, et al. Reduced circulating levels of sTWEAK are associated with NAFLD and may affect hepatocyte triglyceride accumulation. *Int J Obes.* 2016;40(9):1337–45.
192. Avilés-Jurado FX, Terra X, Gómez D, Flores JC, Raventós A, Maymó-Masip E, et al. Low blood levels of sTWEAK are related to locoregional failure in head and neck cancer. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2014;272(7):1733–41.
193. Terra X, Gómez D, García-Lozano J, Flores J, Figuerola E, Mora J, et al. External validation of sTWEAK as a prognostic noninvasive biomarker for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2016;38(1):1358–63.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

194. Maarouf A, Stephan D, Ranjeva MP, Ranjeva JP, Pelletier J, Audoin B, et al. High levels of serum soluble TWEAK are associated with neuroinflammation during multiple sclerosis. *J Transl Med.* 2019 Feb 20;17(51):1–10.
195. Inta I, Frauenknecht K, Dörr H, Kohlhof P, Rabsilber T, Auffarth GU, et al. Induction of the cytokine TWEAK and its receptor Fn14 in ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2008 Dec 15;275(1–2):117–20.
196. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Orbe J, Páramo JA, Michel JB, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Apr;27(4):916–22.
197. Hiraoka A, Horiike N, Akbar SMF, Michitaka K, Matsuyama T, Onji M. Soluble CD163 in patients with liver diseases: very high levels of soluble CD163 in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol.* 2005 Jan;40(1):52–6.
198. Dereke J, Nilsson J, Nilsson C, Strevens H, Landin-Olsson M, Hillman M. Soluble CD163 and TWEAK in early pregnancy gestational diabetes and later glucose intolerance. *PLoS One.* 2019 May 1;14(5).
199. Karadurmus N, Tapan S, Cakar M, Naharci I, Celik T, Tasci I, et al. Lower plasma soluble TWEAK concentration in patients with newly diagnosed hypertension. *Clin Invest Med.* 2012;35(1).
200. López-Dupla M, Maymó-Masip E, Martínez E, Domingo P, Leal M, Peraire J, et al. HIV-1/HAART-Related Lipodystrophy Syndrome (HALS) Is Associated with Decreased Circulating sTWEAK Levels. *PLoS One.* 2015 Dec 1;10(12).
201. Schwartz N, Rubinstein T, Burkly LC, Collins CE, Blanco I, Su L, et al. Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: A multicenter cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):1–10.
202. Møller HJ, De Fost M, Aerts H, Hollak C, Moestrup SK. Plasma level of the macrophage-derived soluble CD163 is increased and positively correlates with severity in Gaucher's disease. *Eur J Haematol.* 2004 Feb;72(2):135–9.
203. Rodríguez-Muguruza S, Altuna-Coy A, Castro-Oneiro S, Poveda-Elices MJ, Fontova-Garrofé R, Chacón MR. A Serum Biomarker Panel of exomiR- 451a , exomiR-25-3p and Soluble TWEAK for Early Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2021;12(November):1–13.
204. Zulfikaroglu B, Isman FK, Bora G, Akgul O, Ozalp N. Serum levels of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in predicting the severity of acute pancreatitis. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2019 Jun 1;45(3):539–43.
205. Tan D, Pang FM, Li D, Zhang L, Wu J, Liu ZQ, et al. Overexpression of Fn14 in gliomas: Tumor progression and poor prognosis. *Futur Oncol.* 2018;14(13):1273–84.
206. Bloemendal S, Kück U. Cell-to-cell communication in plants , animals , and fungi : a comparative review. *Naturwissenschaften.* 2013;100:3–19.
207. Gerdes H, Pepperkok R. Cell-to-cell communication : current views and future perspectives. *Cell Tissue Res.* 2013;352:1–3.
208. Revel JP, Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Celllular Biol.* 1967;33(3):C7–12.
209. Ramírez-Weber FA, Kornberg TB. Cytonemes: Cellular Processes that Project to the Principal Signaling Center in Drosophila Imaginal Discs. *Cell.* 1999;97:599–607.
210. Majka M, Janowska-wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzowski Z, Kowalska MA, et al. Numerous growth factors , cytokines , and chemokines are secreted by human CD34+ cells , myeloblasts , erythroblasts , and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Hematopoiesis.* 2001;97(10):3075–85.
211. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol.* 1967 May 1;13(3):269–88.
212. Traby L, Kaider A, Kollars M, Eichinger S, Wolzt M, Kyrle PA. Effects of clopidogrel with or without aspirin on the generation of extracellular vesicles in the microcirculation and in venous blood: A randomized placebo controlled trial. *Thromb Res.* 2018 Jul 1;167:149–55.
213. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, Klein JB. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Dec 1;13(12):731–49.
214. Cao Z, Wu Y, Liu G, Jiang Y, Wang X, Wang Z, et al. α -Synuclein in salivary extracellular vesicles as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2019 Mar 23;696:114–20.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

215. Guha D, Lorenz DR, Misra V, Chettimada S, Morgello S, Gabuzda D. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles reveals synaptic injury, inflammation, and stress response markers in HIV patients with cognitive impairment. *J Neuroinflammation*. 2019 Dec 5;16(1).
216. Vojtech L, Zhang M, Davé V, Levy C, Hughes SM, Wang R, et al. Extracellular vesicles in human semen modulate antigen-presenting cell function and decrease downstream antiviral T cell responses. *PLoS One*. 2019;14(10).
217. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(8):E968–77.
218. Patil AA, Rhee WJ. Exosomes: Biogenesis, Composition, Functions, and Their Role in Pre-metastatic Niche Formation. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2019;24(5):689–701.
219. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (80-)*. 2020;367(640).
220. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239–57.
221. Zabeo D, Cvjetkovic A, Lässer C, Schorb M, Lötvall J, Höög JL. Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology. *J Extracell Vesicles*. 2017 Dec 1;6(1):1329476.
222. Anthony DF, Shields PG. Exploiting paracrine mechanisms of tissue regeneration to repair damaged organs. *Transplant Res*. 2013 Jun 20;2(10).
223. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles*. 2013;2(1):1–10.
224. Johnstone RM, Adam M, Hammonds JR, Orro L, Turbide C. Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987 Jul 5;262(19):9412–20.
225. Zhu Q, Heon M, Zhao Z, He M. Microfluidic engineering of exosomes: Editing cellular messages for precision therapeutics. *Lab Chip*. 2018 Jun 21;18(12):1690–703.
226. Trams EG, Lauter CJ, Norman Salem J, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *BBA - Biomembr*. 1981 Jun 6;645(1):63–70.
227. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983 Jul 1;33(3):967–78.
228. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1983;97(2):329–39.
229. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789–804.
230. Enderle D, Spiel A, Coticchia CM, Berghoff E, Mueller R, Schlumpberger M, et al. Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method. Bouma GJ, editor. *PLoS One*. 2015 Aug 28;10(8).
231. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 2019;9(1):1–18.
232. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J*. 2011 Aug 31;30(17):3481–500.
233. Vlassov A V., Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2012 Jul;1820(7):940–8.
234. Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular Body Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:337–62.
235. Sinha S, Hoshino D, Hong NH, Kirkbride KC, Grega-Larson NE, Seiki M, et al. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol*. 2016 Jul 18;214(2):197–213.
236. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fangel I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010 Jan 6;12(1):19–30.
237. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30(1):255–89.
238. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaie F, Alahari SK. Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer.* 2019 Apr 2;18(1):1–14.
239. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles.* 2014;3(23743):1–14.
240. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Jan 1;75(2):193–208.
241. Bonifacino JS, Glick BS. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):153–66.
242. Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem.* 2003 May 30;278(22):20083–90.
243. Cruz De los Santos M, Dragomir MP, Calin GA. The role of exosomal long non-coding RNAs in cancer drug resistance. *Cancer Drug Resist.* 2019;2:1178–92.
244. Vulpis E, Soriani A, Cerboni C, Santoni A, Zingoni A. Cancer exosomes as conveyors of stress-induced molecules: New players in the modulation of NK cell response. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 1;20(3).
245. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia.* 2015 Dec;3:83–92.
246. Panigrahi GK, Praharaj PP, Peak TC, Long J, Singh R, Rhim JS, et al. Hypoxia-induced exosome secretion promotes survival of African-American and Caucasian prostate cancer cells. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8:3853.
247. Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med.* 2018 Oct 20;23:50.
248. Gao W, Liu H, Yuan J, Wu C, Huang D, Ma Y, et al. Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- α mediated NF- κ B pathway. *J Cell Mol Med.* 2016 Dec 1;20(12):2318–27.
249. Chaudhuri AD, Dastgheyb RM, Yoo S-W, Trout A, Talbot Jr CC, Hao H, et al. TNF α and IL-1 β modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):1–18.
250. Domenis R, Cifù A, Quaglia S, Pistis C, Moretti M, Vicario A, et al. Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8(1):1–11.
251. Wang K, Ye L, Lu H, Chen H, Zhang Y, Huang Y, et al. TNF- α promotes extracellular vesicle release in mouse astrocytes through glutaminase. *J Neuroinflammation.* 2017 Dec 20;14(1):87.
252. Bodega G, Alique M, Puebla L, Carracedo J, Ramírez RM. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *J Extracell Vesicles.* 2016;8(1):1–10.
253. El Golli-Bennour E, Bacha H. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology.* 2011 Sep 5;287(1–3):1–7.
254. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M. Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol Lett.* 2007 Nov 15;113(2):76–82.
255. Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* 2011 Mar 27;11.
256. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles.* 2014;3(1):24641.
257. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* 2015 Feb 1;13(1):17–24.
258. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol.* 2014;28:3–13.
259. Wu D, Yan J, Shen X, Sun Y, Thulin M, Cai Y, et al. Profiling surface proteins on individual exosomes using a proximity barcoding assay. *Nat Cell Biol.* 2019;10(3854):1–10.
260. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(2015):1–60.
261. Tan N-S, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, et al. Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription. *Mol Cell Biol*. 2002 Jul 15;22(14):5114–27.
262. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*. 2010 Aug 27;51(8):2105–20.
263. Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res*. 2019;60(1):9–18.
264. Lunavat TR, Cheng L, Kim DK, Bhadury J, Jang SC, Lässer C, et al. Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – Evidence of unique microRNA cargos. *RNA Biol*. 2015 Jan 1;12(8):810–23.
265. Turchinovich A, Drapkina O, Tonevitsky A. Transcriptome of Extracellular Vesicles: State-of-the-Art. *Front Immunol*. 2019 Feb 28;10:202.
266. Zhou C, Tan L, Sun Y, Qiu X, Liao Y, Song C, et al. Exosomes carry microRNAs into Neighboring Cells to Promote Diffusive Infection of Newcastle Disease Virus. *Viruses*. 2019 Jun;11(6):527.
267. Wang L, Li Y, Guan X, Zhao J, Shen L, Liu J. Exosomal double-stranded DNA as a biomarker for the diagnosis and preoperative assessment of pheochromocytoma and paraganglioma. *Mol Cancer*. 2018 Aug 23;17(1):128.
268. Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: The next step. *Oncogene*. 2010 Apr 1;29(15):2161–4.
269. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843–54.
270. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquienelli AE, Bettlinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901–6.
271. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (80-)*. 2001 Oct 26;294(5543):853–8.
272. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;
273. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051–60.
274. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004 Dec;10(12):1957–66.
275. Nishikura K. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Feb 1;17(2):83–96.
276. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):235–40.
277. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):231–5.
278. Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. IsomiRs - The overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet*. 2012 Nov;28(11):544–9.
279. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A high-Resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science (80-)*. 2009 Nov 27;326(5957):1275–9.
280. Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 29;113(13):E1881–9.
281. Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, Doudna JA. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(13):6568–76.
282. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):621–9.
283. Song JB, Song J, Mo BX, Chen XM. Uridylation and adenylation of RNAs. *Sci China Life Sci*. 2015 Nov 1;58(11):1057–66.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

284. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrnas regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem.* 2013 Apr 12;288(15):10849–59.
285. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* 2013 Dec 20;4:2980.
286. Danijela Koppers-Lalic A, Hacken-berg M, Meijer GA, Michiel Pegtel Correspondence dkoppers D, Koppers-Lalic D, Hackenberg M, et al. Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes. *Cell Rep.* 2014;8:1649–58.
287. Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, et al. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol.* 2009 Aug 16;11(9):1150–6.
288. Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet.* 2014;5(FEB):1–10.
289. Ab Mutalib N-S, Sulaiman SA, Jamal R. Computational Tools for microRNA Target Prediction. *Comput Epigenetics Dis.* 2019;79–105.
290. Riffo-Campos AL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? *Int J Mol Sci.* 2016;17:1987.
291. Wang Z, Liu Y. Predicting functional MicroRNA-mRNA interactions. *Methods Mol Biol.* 2017;1580:117–26.
292. Hausser J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions-beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet.* 2014;15(9):599–612.
293. Elton TS, Yalowich JC. Experimental procedures to identify and validate specific mRNA targets of miRNAs. *EXCLI J.* 2015;14:758–90.
294. Clément T, Salone V, Rederstorff M. Dual luciferase gene reporter assays to study miRNA Function. *Methods Mol Biol.* 2015;1296:187–98.
295. Spengler RM, Zhang X, Cheng C, Mclendon JM, Skeie JM, Johnson FL, et al. Elucidation of transcriptome-wide microRNA binding sites in human cardiac tissues by Ago2 HITS-CLIP. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(15):7120–31.
296. Ingenito F, Roscigno G, Affnito A, Nuzzo S, Scognamiglio I, Quintavalle C, et al. The Role of Exo-miRNAs in Cancer: A Focus on Therapeutic and Diagnostic Applications. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 1;20:4687.
297. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 1;105(13):5166–71.
298. Wang M, Yu F, Ding H, Wang Y, Li P, Wang K. Emerging Function and Clinical Values of Exosomal MicroRNAs in Cancer. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2019 Jun 7;16:791–804.
299. Zhang L, Zhang S, Yao J, Lowery FJ, Zhang Q, Huang WC, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature.* 2015 Nov 5;527(7576):100–4.
300. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, et al. Cancer-Secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell.* 2014 Apr 14;25(4):501–15.
301. Tominaga N, Kosaka N, Ono M, Katsuda T, Yoshioka Y, Tamura K, et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun.* 2015 Apr 1;6:6716.
302. Le MTN, Hamar P, Guo C, Basar E, Perdigo-Henriques R, Balaj L, et al. MiR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *J Clin Invest.* 2014 Dec 1;124(12):5109–28.
303. Li XJ, Ren ZJ, Tang JH, Yu Q. Exosomal MicroRNA MiR-1246 Promotes Cell Proliferation, Invasion and Drug Resistance by Targeting CCNG2 in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2017 Jan 1;44(5):1741–8.
304. Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2015 Feb 17;17(2):183–94.
305. Fang JH, Zhang ZJ, Shang LR, Luo YW, Lin YF, Yuan Y, et al. Hepatoma cell-secreted exosomal microRNA-103 increases vascular permeability and promotes metastasis by targeting junction proteins. *Hepatology.* 2018 Oct 1;68(4):1459–75.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

306. Sruthi T V., Edatt L, Raji GR, Kunhiraman H, Shankar SS, Shankar V, et al. Horizontal transfer of miR-23a from hypoxic tumor cell colonies can induce angiogenesis. *J Cell Physiol.* 2018 Apr 1;233(4):3498–514.
307. Kobayashi M, Salomon C, Tapia J, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE. Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. *J Transl Med.* 2014 Jan 6;12:4.
308. Liao J, Liu R, Shi YJ, Yin LH, Pu YP. Exosome-shuttling microRNA-21 promotes cell migration and invasion-targeting PDCD4 in esophageal cancer. *Int J Oncol.* 2016 Jun 1;48(6):2567–79.
309. Bao L, You B, Shi S, Shan Y, Zhang Q, Yue H, et al. Metastasis-associated miR-23a from nasopharyngeal carcinoma-derived exosomes mediates angiogenesis by repressing a novel target gene TSGA10. *Oncogene.* 2018 May 1;37(21):2873–89.
310. Cai Q, Zhu A, Gong L. Exosomes of glioma cells deliver miR-148a to promote proliferation and metastasis of glioblastoma via targeting CADM1. *Bull Cancer.* 2018 Jul 1;105(7–8):643–51.
311. Yang H, Fu H, Wang B, Zhang X, Mao J, Li X, et al. Exosomal miR-423-5p targets SUFU to promote cancer growth and metastasis and serves as a novel marker for gastric cancer. *Mol Carcinog.* 2018 Sep 1;57(9):1223–36.
312. Felicetti F, De Feo A, Coscia C, Puglisi R, Pedini F, Pasquini L, et al. Exosome-mediated transfer of miR-222 is sufficient to increase tumor malignancy in melanoma. *J Transl Med.* 2016 Feb 24;14(56).
313. Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, et al. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett.* 2016 Jan 1;370(1):125–35.
314. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 31;109(31):E2110.
315. Ying X, Wu Q, Wu X, Zhu Q, Wang X, Jiang L, et al. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget.* 2016;7(28):43076–87.
316. Zhou M, Chen J, Zhou L, Chen W, Ding G, Cao L. Pancreatic cancer derived exosomes regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203. *Cell Immunol.* 2014 Nov 1;292(1–2):65–9.
317. Ding G, Zhou L, Qian Y, Fu M, Chen J, Chen J, et al. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. *Oncotarget.* 2015;6(30):29877–88.
318. Ye SB, Zhang H, Cai TT, Liu YN, Ni JJ, He J, et al. Exosomal miR-24-3p impedes T-cell function by targeting FGF11 and serves as a potential prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol.* 2016 Nov 1;240(3):329–40.
319. Challagundla KB, Wise PM, Neviani P, Chava H, Murtadha M, Xu T, et al. Exosome-Mediated Transfer of microRNAs Within the Tumor Microenvironment and Neuroblastoma Resistance to Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(7):135.
320. Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Su F, Lin L, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer.* 2011 Sep 22;10:117.
321. Berchem G, Noman MZ, Bosseler M, Paggetti J, Baconnais S, Le cam E, et al. Hypoxic tumor-derived microvesicles negatively regulate NK cell function by a mechanism involving TGF- β and miR23a transfer. *Oncoimmunology.* 2016 Apr 2;5(4):e1062968.
322. Qin X, Yu S, Zhou L, Shi M, Hu Y, Xu X, et al. cisplatin-resistant lung cancer cell-derived exosomes increase cisplatin resistance of recipient cells in exosomal mir-100-5p-dependent manner. *Int J Nanomedicine.* 2017;12–3721.
323. Zheng P, Chen L, Yuan X, Luo Q, Liu Y, Xie G, et al. Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Dec 13;36(1):53.
324. Wang M, Qiu R, Yu S, Xu X, Li G, Gu R, et al. Paclitaxel-resistant gastric cancer MGC-803 cells promote epithelial-to-mesenchymal transition and chemoresistance in paclitaxel-sensitive cells via exosomal delivery of miR-155-5p. *Int J Oncol.* 2019 Jan 1;54(1):326–38.
325. Fu X, Liu M, Qu S, Ma J, Zhang Y, Shi T, et al. Exosomal microRNA-32-5p induces multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018 Mar 12;37(1):52.
326. Lou G, Song X, Yang F, Wu S, Wang J, Chen Z, et al. Exosomes derived from MIR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol.* 2015 Oct

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- 29;8:122.
327. Mikamori M, Yamada D, Eguchi H, Hasegawa S, Kishimoto T, Tomimaru Y, et al. MicroRNA-155 controls exosome synthesis and promotes gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2017 Feb 15;7(1):1–14.
328. Yang Z, Zhao N, Cui J, Wu H, Xiong J, Peng T. Exosomes derived from cancer stem cells of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells enhance drug resistance by delivering miR-210. *Cell Oncol.* 2020 Feb 1;43(1):123–36.
329. Binenbaum Y, Fridman E, Yaari Z, Milman N, Schroeder A, David G Ben, et al. Transfer of miRNA in macrophage-derived exosomes induces drug resistance in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2018 Sep 15;78(18):5287–99.
330. Au Yeung CL, Co NN, Tsuruga T, Yeung TL, Kwan SY, Leung CS, et al. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun.* 2016 Mar 29;7(1):1–14.
331. Weiner-Gorzal K, Dempsey E, Milewska M, McGoldrick A, Toh V, Walsh A, et al. Overexpression of the microRNA miR-433 promotes resistance to paclitaxel through the induction of cellular senescence in ovarian cancer cells. *Cancer Med.* 2015 May 1;4(5):745–58.
332. Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Sep 1;147(2):423–31.
333. O'Brien K, Lowry MC, Corcoran C, Martinez VG, Daly M, Rani S, et al. miR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity. *Oncotarget.* 2015;6(32):32774–89.
334. Qin X, Guo H, Wang X, Zhu X, Yan M, Wang X, et al. Exosomal miR-196a derived from cancer-associated fibroblasts confers cisplatin resistance in head and neck cancer through targeting CDKN1B and ING5. *Genome Biol.* 2019 Jan 14;20:12.
335. Gold P, Freedman SO. Demonstration of Tumor-Specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med.* 1965;121(3):439–62.
336. Yin BWT, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: Identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem.* 2001 Jul 20;276(29):27371–5.
337. Dilsiz N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. *Futur Sci OA.* 2020;6(4):FSO465.
338. Ragusa M, Barbagallo C, Ciriigliaro M, Battaglia R, Brex D, Caponnetto A, et al. Asymmetric RNA distribution among cells and their secreted exosomes: Biomedical meaning and considerations on diagnostic applications. *Front Mol Biosci.* 2017 Oct 4;4:66.
339. Jia S, Zhang R, Li Z, Li J. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(33):55632–45.
340. Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S, et al. Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol.* 2011;2(4):215–21522.
341. Sanz-Rubio D, Martin-Burriel I, Gil A, Cubero P, Forner M, Khalyfa A, et al. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8:10306.
342. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008 Jul;110(1):13–21.
343. Maeda K, Sasaki H, Ueda S, Miyamoto S, Terada S, Konishi H, et al. Serum exosomal microRNA-34a as a potential biomarker in epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2020 Dec;13:47.
344. Tang Y, Zhao Y, Song X, Song X, Niu L, Xie L. Tumor-derived exosomal miRNA-320d as a biomarker for metastatic colorectal cancer. *J Clin Lab Anal.* 2019 Nov 1;33:e23004.
345. Min L, Chen L, Liu S, Yu Y, Guo Q, Li P, et al. Loss of Circulating Exosomal miR-92b is a Novel Biomarker of Colorectal Cancer at Early Stage. *Int J Med Sci.* 2019;16:1231–7.
346. Hannafon BN, Trigoso YD, Calloway CL, Zhao YD, Lum DH, Welm AL, et al. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2016 Sep 8;18:90.
347. Hirschfeld M, Rücker G, Weiß D, Berner K, Ritter A, Jäger M, et al. Urinary Exosomal MicroRNAs as Potential Non-invasive Biomarkers in Breast Cancer Detection. *Mol Diagnosis Ther.* 2020 Apr 1;24(2):215–32.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

348. Wang N, Guo W, Song X, Liu L, Niu L, Song X, et al. Tumor-associated exosomal miRNA biomarkers to differentiate metastatic vs. nonmetastatic non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(9):1535–45.
349. Jin X, Chen Y, Chen H, Fei S, Chen D, Cai X, et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing. *Clin Cancer Res.* 2017 Sep 1;23(17):5311–9.
350. Tang S, Cheng J, Yao Y, Lou C, Wang L, Huang X, et al. Combination of Four Serum Exosomal MiRNAs as Novel Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Gastric Cancer. *Front Genet.* 2020 Mar 17;11:237.
351. Zhang W, Ni M, Su Y, Wang H, Zhu S, Zhao A, et al. Kidney Cancer MicroRNAs in Serum Exosomes as Potential Biomarkers in Clear-cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus.* 2018;4:412–9.
352. Yoshizawa N, Sugimoto K, Tameda M, Inagaki Y, Ikejiri M, Inoue H, et al. MiR-3940-5p/miR-8069 ratio in urine exosomes is a novel diagnostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2020;19(4):2677–84.
353. Zhou X, Lu Z, Wang T, Huang Z, Zhu W, Miao Y. Plasma miRNAs in diagnosis and prognosis of pancreatic cancer: A miRNA expression analysis. *Gene.* 2018 Oct 5;673:181–93.
354. Ronquist G, Brody I. The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr.* 1985;822(2):203–18.
355. Vlaeminck-Guillem V. Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis, Diagnosis, and Management. *Front Oncol.* 2018;8:222.
356. Hosseini-Beheshti E, Choi W, Weiswald LB, Kharmate G, Ghaffari M, Roshan-Moniri M, et al. Exosomes confer pro-survival signals to alter the phenotype of prostate cells in their surrounding environment. *Oncotarget.* 2016 Mar 22;7(12):14639–58.
357. Lundholm M, Schröder M, Nagaeva O, Baranov V, Widmark A, Mincheva-Nilsson L, et al. Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: Mechanism of immune evasion. *PLoS One.* 2014 Sep 30;9(9):e108925.
358. Bhagirath D, Yang TL, Bucay N, Sekhon K, Majid S, Shahryari V, et al. microRNA-1246 is an exosomal biomarker for aggressive prostate cancer. *Cancer Res.* 2018 Apr 1;78(7):1833–44.
359. Corcoran C, Rani S, O'Driscoll L. MiR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression. *Prostate.* 2014;74(13):1320–34.
360. Cao Z, Xu L, Zhao S. Exosome-derived miR-27a produced by PSC-27 cells contributes to prostate cancer chemoresistance through p53. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Jul 23;515(2):345–51.
361. Li SL, An N, Liu B, Wang SY, Wang JJ, Ye Y. Exosomes from LNCaP cells promote osteoblast activity through miR-375 transfer. *Oncol Lett.* 2019 May 1;17(5):4463–73.
362. Li J, Yang X, Guan H, Mizokami A, Keller ET, Xu X, et al. Exosome-derived microRNAs contribute to prostate cancer chemoresistance. *Int J Oncol.* 2016 Aug 1;49(2):838–46.
363. Kim J, Morley S, Le M, Bedoret D, Umetsu DT, Di Vizio D, et al. Enhanced shedding of extracellular vesicles from amoeboid prostate cancer cells Potential effects on the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(4):409–18.
364. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JWF, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2012 Feb;106(4):768–74.
365. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2015 Jan 1;67(1):33–41.
366. Endzeliņš E, Berger A, Melne V, Bajo-Santos C, Soboļevska K, Ābols A, et al. Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer.* 2017;17(1):730.
367. Li Z, Ma YY, Wang J, Zeng XF, Li R, Kang W, et al. Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *Onco Targets Ther.* 2015 Dec 31;9:139–48.
368. Xu Y, Qin S, An T, Tang Y, Huang Y, Zheng L. MiR-145 detection in urinary extracellular vesicles increase diagnostic efficiency of prostate cancer based on hydrostatic filtration dialysis method. *Prostate.* 2017 Jul 1;77(10):1167–75.
369. Barceló M, Castells M, Bassas L, Vigués F, Larriba S. Semen miRNAs Contained in Exosomes as Non-

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- Invasive Biomarkers for Prostate Cancer Diagnosis. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1):1–16.
370. Bryzgunova OE, Zaripov MM, Skvortsova TE, Lekchnov EA, Grigor'eva AE, Zaporozhchenko IA, et al. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients. *PLoS One.* 2016 Jun 15;11(6):e0157566.
371. Wani S, Kaul D, Mavuduru RS, Kakkar N, Bhatia A. Urinary-exosomal miR-2909: A novel pathognomonic trait of prostate cancer severity. *J Biotechnol.* 2017 Oct 10;259:135–9.
372. Rodríguez M, Bajo-Santos C, Hessvik NP, Lorenz S, Fromm B, Berge V, et al. Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Mol Cancer.* 2017 Oct 5;16(1):156.
373. Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, Glotov A, Tsyrlina E, Berstein L, et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate.* 2016 Jan 1;76(1):68–79.
374. Foj L, Ferrer F, Serra M, Arévalo A, Gavagnach M, Giménez N, et al. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. *Prostate.* 2017 May 1;77(6):573–83.
375. Tessitore A, Ciccirelli G, Mastroiaco V, Del Vecchio F, Capece D, Verzella D, et al. Therapeutic Use of MicroRNAs in Cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;16(1):7–19.
376. Gurunathan S, Kang M, Jeyaraj M, Qasim M, Kim J. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 2019;8(307):1–36.
377. Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunol Rev.* 2013 Jan;251(1):125–42.
378. Katakowski M, Buller B, Zheng X, Lu Y, Rogers T, Osobamiro O, et al. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett.* 2013 Jul;335(1):201–4.
379. Schmittgen TD. Exosomal miRNA cargo as mediator of immune escape mechanisms in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2019;79(7):1293–4.
380. Saumet A, Mathelier A, Lecellier C. The Potential of microRNAs in Personalized Medicine Against Cancers. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–11.
381. Zhang S, Chen L, Jung EJ, Calin GA. Targeting MicroRNAs With Small Molecules: From Dream to Reality. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Jun 28;87(6):754–8.
382. Maolake A, Izumi K, Natsagdorj A, Iwamoto H, Kadomoto S, Makino T, et al. Tumor necrosis factor- α induces prostate cancer cell migration in lymphatic metastasis through CCR7 upregulation. *Cancer Sci.* 2018;109(5):1524–31.
383. Udartseva OO, Gollnick SO. The dark side of IL-1: role in prostate cancer progression. *J Immunol.* 2019;202(1 Supplement).
384. Maynard JP, Ertunc O, Kulac I, Baena-Del Valle JA, De Marzo AM, Sfanos KS. IL-8 Expression Is Associated with Prostate Cancer Aggressiveness and Androgen Receptor Loss in Primary and Metastatic Prostate Cancer. *Mol Cancer Res.* 2020;18(1):153–65.
385. Zhang Q, Liu S, Parajuli KR, Zhang W, Zhang K, Mo Z, et al. Interleukin-17 promotes prostate cancer via MMP7-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene.* 2016 Jul 4;36(5):687–99.
386. Cao Z, Kyprianou N. Mechanisms navigating the TGF-B pathway in prostate cancer. *Asian J Urol.* 2015;2(1):11–8.
387. Arcaro A. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer. *Front Pharmacol.* 2013;4 MAR(March):1–8.
388. Capoluongo E. Insulin-like growth factor system and sporadic malignant melanoma. *Am J Pathol.* 2011;178(1):26–31.
389. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel).* 2017;9(5):52.
390. Corn PG, Wang F, McKeehan WL, Navone N. Targeting Fibroblast Growth Factor Pathways in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(21):5856–66.
391. A. FF, J. ML, I. AR, H. KS, C. AP, P. LV, et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Prostate Cancer: In Situ and in Vitro Expression of VEGF by Human Prostate Cancer Cells. *J Urol.*

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- 1997 Jun 1;157(6):2329–33.
392. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lössner U, Blüher M, et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):440–4.
393. Díaz-López A, Bulló M, Chacón MR, Estruch R, Vendrell J, Díez-Espino J, et al. Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13(1):51.
394. Yin JJ, Liu YN, Tillman H, Barrett B, Hewitt S, Ylaya K, et al. AR-regulated TWEAK-FN14 pathway promotes prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res*. 2014;74(16):4306–17.
395. Altuna-Coy A, Ruiz-Plazas X, Alves-Santiago M, Segarra-Tomás J, Chacón MR. Serum Levels of the Cytokine TWEAK Are Associated with Metabolic Status in Patients with Prostate Cancer and Modulate Cancer Cell Lipid Metabolism In Vitro. *Cancers (Basel)*. 2021;13(18):4688.
396. Blanco-Colio LM. TWEAK/Fn14 axis: A promising target for the treatment of cardiovascular diseases. *Front Immunol*. 2014;5:3.
397. Weinstein SJ, Mackrain K, Stolzenberg-Solomon RZ, Selhub J, Virtamo J, Albanes D. Serum creatinine and prostate cancer risk in a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2009 Oct;18(10):2643–9.
398. Simón-Muela I, Llauradó G, Chacón MR, Olona M, Näf S, Maymó-Masip E, et al. Reduced circulating levels of TWEAK are associated with gestational diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. 2015 Jan;45(1):27–35.
399. Nandeesh H. Insulin: a novel agent in the pathogenesis of prostate cancer. *Int Urol Nephrol*. 2008;41(2):267.
400. Hammarsten J, Högstedt B. Hyperinsulinaemia: a prospective risk factor for lethal clinical prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2005 Dec;41(18):2887–95.
401. Di Sebastiano KM, Pinthus JH, Duivenvoorden WCM, Mourtzakis M. Glucose impairments and insulin resistance in prostate cancer: the role of obesity, nutrition and exercise. *Obes Rev an Off J Int Assoc Study Obes*. 2018 Jul;19(7):1008–16.
402. Liu Y, Zuchier LS, Ghesani N V. Dominant Uptake of Fatty Acid over Glucose by Prostate Cells: A Potential New Diagnostic and Therapeutic Approach. *Anticancer Res*. 2010 Feb 1;30(2):369–74.
403. Dueregger A, Schöpf B, Eder T, Höfer J, Gnaiger E, Aufinger A, et al. Differential Utilization of Dietary Fatty Acids in Benign and Malignant Cells of the Prostate. *PLoS One*. 2015;10(8):1–20.
404. Cheng X, Li J, Guo D. SCAP/SREBPs Are Central Players in Lipid Metabolism and Novel Metabolic Targets in Cancer Therapy. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(6):484–93.
405. Tao T, Su Q, Xu S, Deng J, Zhou S, Zhuang Y, et al. Down-regulation of PKM2 decreases FASN expression in bladder cancer cells through AKT/mTOR/SREBP-1c axis. *J Cell Physiol*. 2019 Mar 1;234(3):3088–104.
406. Li L, Ameri AH, Wang S, Jansson KH, Casey OM, Qi Y, et al. EGR1 Regulates Angiogenic and Osteoclastogenic Factors in Prostate Cancer and Promotes Metastasis. *Oncogene*. 2019;38(35):6241–55.
407. Zhi-Chun L, Qiao-Ling Z, Zhi-Qin L, Xiao-Zhao L, Xiao-xia Z, Rong T. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) mediates p38 mitogen-activated protein kinase activation and signal transduction in peripheral blood mononuclear cells from patients with lupus nephritis. *Inflammation*. 2012 Jun;35(3):935–43.
408. Li H, Mittal A, Paul PK, Kumar M, Srivastava DS, Tyagi SC, et al. Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis augments matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) production in skeletal muscle through the activation of nuclear factor-kappaB-inducing kinase and p38 mitogen-activated protein kinase: a potential role o. *J Biol Chem*. 2009 Feb;284(7):4439–50.
409. Guo W, Zhang Z, Li G, Lai X, Gu R, Xu W, et al. Pyruvate Kinase M2 Promotes Prostate Cancer Metastasis Through Regulating ERK1/2-COX-2 Signaling. *Front Oncol*. 2020;10:544288.
410. Papa S, Choy PM, Bubici C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene*. 2019;38(13):2223–40.
411. Zhao X, Zhao L, Yang H, Li J, Min X, Yang F, et al. Pyruvate kinase M2 interacts with nuclear sterol regulatory element-binding protein 1a and thereby activates lipogenesis and cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem*. 2018/03/07. 2018 Apr 27;293(17):6623–34.

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

412. Shorning BY, Dass MS, Smalley MJ, Pearson HB. The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun;21(12).
413. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, et al. Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. *Cancer Res.* 2004;64(11):3892–9.
414. Götting I, Jendrossek V, Matschke J. A New Twist in Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Altered Cancer Cell Metabolism in Akt-Mediated Therapy Resistance. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22).
415. Liu Y, Wang R, Zhang L, Li J, Lou K, Shi B. The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism via the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4685–90.
416. McCracken SRC, Ramsay A, Heer R, Mathers ME, Jenkins BL, Edwards J, et al. Aberrant expression of extracellular signal-regulated kinase 5 in human prostate cancer. *Oncogene.* 2008;27(21):2978–88.
417. Al-Saffar NMS, Troy H, Wong Te Fong A-C, Paravati R, Jackson LE, Gowan S, et al. Metabolic biomarkers of response to the AKT inhibitor MK-2206 in pre-clinical models of human colorectal and prostate carcinoma. *Br J Cancer.* 2018;119(9):1118–28.
418. Atrekhany K-SN, Drutskaya MS, Nedospasov SA, Grivennikov SI, Kuprash D V. Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment. *Pharmacol Ther.* 2016;168:98–112.
419. Ma Q, Liang M, Wu Y, Dou C, Xu J, Dong S, et al. Small extracellular vesicles deliver osteolytic effectors and mediate cancer-induced osteolysis in bone metastatic niche. *J Extracell vesicles.* 2021 Feb;10(4):e12068.
420. Henrich SE, McMahon KM, Plebanek MP, Calvert AE, Feliciano TJ, Parrish S, et al. Prostate cancer extracellular vesicles mediate intercellular communication with bone marrow cells and promote metastasis in a cholesterol-dependent manner. *J Extracell vesicles.* 2020 Dec;10(2):e12042.
421. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. *Molecules.* 2014;19(2):1568–75.
422. Rani P, Vashisht M, Golla N, Shandilya S, Onteru SK, Singh D. Milk miRNAs encapsulated in exosomes are stable to human digestion and permeable to intestinal barrier in vitro. *J Funct Foods.* 2017;34:431–9.
423. Welch JL, Madison MN, Margolick JB, Galvin S, Gupta P, Martínez-Maza O, et al. Effect of prolonged freezing of semen on exosome recovery and biologic activity. *Sci Rep.* 2017;7(1):45034.
424. Wu J, Shen Z. Exosomal miRNAs as biomarkers for diagnostic and prognostic in lung cancer. *Cancer Med.* 2020;9(19):6909–22.
425. Sorop A, Constantinescu D, Cojocaru F, Dinischiotu A, Cucu D, Dima SO. Exosomal microRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets for Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2021 May;22(9):4997.
426. Todorova VK, Byrum SD, Gies AJ, Haynie C, Smith H, Reyna NS, et al. Circulating Exosomal microRNAs as Predictive Biomarkers of Neoadjuvant Chemotherapy Response in Breast Cancer. *Curr Oncol.* 2022 Jan;29(2):613–30.
427. Dohmen J, Semaan A, Kobilya M, Zaleski M, Branchi V, Schlierf A, et al. Diagnostic Potential of Exosomal microRNAs in Colorectal Cancer. *Diagnostics.* 2022;12(6):1413.
428. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab.* 2019 Oct;30(4):656–73.
429. Ruiz-Plazas X, Altuna-Coy A, Alves-Santiago M, Vila-Barja J, García-Fontgivell JF, Martínez-González S, et al. Liquid Biopsy-Based Exo-oncomiRNAs Can Predict Prostate Cancer Aggressiveness. *Cancers (Basel).* 2021 Jan;13(2):250.
430. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, 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.* 2018 Jan 1;7:1535750.
431. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafrè SA, et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem.* 2007 Aug;282(32):23716–24.
432. Ergun S, Tayeb TS, Arslan A, Temiz E, Arman K, Safdar M, et al. The investigation of miR-221-3p and PAK1 gene expressions in breast cancer cell lines. *Gene.* 2015;555(2):377–81.
433. Shi J, Zhang Y, Jin N, Li Y, Wu S, Xu L. MicroRNA-221-3p Plays an Oncogenic Role in Gastric Carcinoma

Bibliografía

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

- by Inhibiting PTEN Expression. *Oncol Res.* 2017 Apr;25(4):523–36.
434. Song J, Ouyang Y, Che J, Li X, Zhao Y, Yang K, et al. Potential Value of miR-221/222 as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Biomarkers for Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:56.
435. Ibrahim NH, Abdellateif MS, Kassem SH-A, Abd El Salam MA, El Gammal MM. Diagnostic significance of miR-21, miR-141, miR-18a and miR-221 as novel biomarkers in prostate cancer among Egyptian patients. *Andrologia.* 2019 Nov;51(10):e13384.
436. Coarfa C, Fiskus W, Eedunuri VK, Rajapakshe K, Foley C, Chew SA, et al. Comprehensive proteomic profiling identifies the androgen receptor axis and other signaling pathways as targets of microRNAs suppressed in metastatic prostate cancer. *Oncogene.* 2016 May;35(18):2345–56.
437. Wang L, Liu C, Li C, Xue J, Zhao S, Zhan P, et al. Effects of microRNA-221/222 on cell proliferation and apoptosis in prostate cancer cells. *Gene.* 2015 Nov;572(2):252–8.
438. Dart DA, Koushyar S, Lanning BE, Jiang W. MiR-221 Is Specifically Elevated in PC3 Cells and its Deletion Reduces Adhesion, Motility and Growth. *Anticancer Res.* 2019 Oct;39(10):5311–27.
439. Huang Y, Yang Y, He Y, Li J. The emerging role of Nemo-like kinase (NLK) in the regulation of cancers. *Tumor Biol.* 2015 Dec 1;36(12):9147–52.
440. Emami KH, Brown LG, Pitts TEM, Sun X, Vessella RL, Corey E. Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Prostate.* 2009 Oct;69(14):1481–92.
441. He X-Y, Tan Z-L, Mou Q, Liu F-J, Liu S, Yu C-W, et al. microRNA-221 Enhances MYCN via Targeting Nemo-like Kinase and Functions as an Oncogene Related to Poor Prognosis in Neuroblastoma. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017 Jun;23(11):2905–18.
442. Gao S, Bian T, Zhang Y, Su M, Liu Y. TCF12 overexpression as a poor prognostic factor in ovarian cancer. *Pathol Res Pract.* 2019 Sep;215(9):152527.
443. Yang J, Zhang L, Jiang Z, Ge C, Zhao F, Jiang J, et al. TCF12 promotes the tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via upregulation of CXCR4 expression. *Theranostics.* 2019;9(20):5810–27.
444. Lee C-C, Chen W-S, Chen C-C, Chen L-L, Lin Y-S, Fan C-S, et al. TCF12 protein functions as transcriptional repressor of E-cadherin, and its overexpression is correlated with metastasis of colorectal cancer. *J Biol Chem.* 2012 Jan;287(4):2798–809.
445. Chen WS, Chen CC, Chen LL, Lee CC, Huang TS. Secreted heat shock protein 90 α (HSP90 α) induces nuclear factor- κ B-mediated TCF12 protein expression to down-regulate E-cadherin and to enhance colorectal cancer cell migration and invasion. *J Biol Chem.* 2013 Mar 29;288(13):9001–10.
446. Chen Q, Liang Y, Zhang Y, Jiang M, Han Z, Liang Y, et al. Decreased expression of TCF12 contributes to progression and predicts biochemical recurrence in patients with prostate cancer. *Tumor Biol.* 2017 Jun 1;39(6):1010428317703924.
447. Mullany LE, Herrick JS, Wolff RK, Stevens JR, Samowitz W, Slattery ML. Transcription factor-microRNA associations and their impact on colorectal cancer survival. *Mol Carcinog.* 2017 Nov 1;56(11):2512–26.
448. Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(4):258–71.
449. Harries RL, Owen S, Ruge F, Morgan M, Li J, Zhang Z, et al. Impact of pigment epithelium-derived factor on colorectal cancer in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 2018 Apr;9(27):19192–202.
450. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity.* 2019 Jul 16;51(1):27–41.

Publicaciones y Comunicaciones durante la Tesis Doctoral

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DURANTE LA TESIS DOCTORAL

Artículos derivados de la Tesis

Título: Liquid Biopsy-Based Exo-oncomiRNAs Can Predict Prostate Cancer Aggressiveness

Autores: Ruiz-Plazas, X.; **Altuna-Coy, A.**; Alves-Santiago, M.; Vila-Barja, J.; García-Fontgivell, J.F.; Martínez-González, S.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R

Revista científica: Cancers

doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13020250>

Posición autoría: Coprimer autor

Estado: Publicado – 11/01/2021

Área: Oncología – 51/242 (Q1) – Impact Factor 2020: 6,639

Título: Serum Levels of the Cytokine TWEAK Are Associated with Metabolic Status in Patients with Prostate Cancer and Modulate Cancer Cell Lipid Metabolism *In Vitro*.

Autores: **Altuna-Coy, A.**; Ruiz-Plazas, X.; Alves-Santiago, M.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R.

Revista científica: Cancers

doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13184688>

Posición autoría: Coprimer autor

Estado: Publicado – 18/09/2021

Área: Oncología – 51/242 (Q1) – Impact Factor 2020: 6,639

Otros artículos durante la tesis doctoral

Título: Biofluid quantification of TWEAK/Fn14 axis in combination with a selected biomarker panel improves assessment of prostate cancer aggressiveness

Autores: Xavier Ruiz-Plazas, Esther Rodríguez-Gallego, Marta Alves, **Antonio Altuna-Coy**, Javier Lozano-Bartolomé, Manel Portero-Otin, Joan Francesc García-Fontgivell, Salomé Martínez-González, José Segarra & Matilde R. Chacón

Revista científica: Journal of Translational Medicine

doi: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2053-6>

Posición autoría: Coprimer autor

Estado: Publicado – 09/09/2019

Área: Medicine, Research & Experimental – 45/139 (Q2) – Impact Factor 2018: 4,124

Título: A Serum Biomarker Panel of exomiR-451a, exomiR-25-3p and Soluble TWEAK for Early Diagnosis of Rheumatoid Arthritis

Autores: Samantha Rodríguez-Muguruza, **Antonio Altuna-Coy**, Sonia Castro-Oreiro, Maria José Poveda-Elices, Ramon Fontova-Garrofé, Matilde R. Chacón

Revista científica: Frontiers in Immunology

doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.790880>

Posición autoría: Coprimer autor

Estado: Publicado – 15/11/2021

Área: Inmunología – 24/162 (Q1) – Impact Factor 2020: 7,561

Publicaciones y Comunicaciones durante la Tesis Doctoral

Estudio del efecto celular y metabólico del eje TWEAK/Fn14 en el microambiente del cáncer de próstata

Título: The Lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue reveals alterations in tumor cell's metabolic crosstalk**Autores:** Antonio Altuna-Coy, Xavier Ruiz-Plazas, Sílvia Sánchez-Martín, Helena Ascaso-Til, Manel Prados-Saavedra, Marta Alves-Santiago, Xana Bernal-Escoté, José Segarra-Tomás, Matilde Rodríguez Chacón**Revista científica:** BMC Medicine**doi:** <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02457-3>**Posición autoría:** Coprimer autor**Estado:** Publicado – 18/08/2022**Área:** Medicina General e Interna – 21/172 (Q1) – Impact Factor 2021: 11,150**Comunicaciones en Congresos Nacionales e Internacionales realizadas durante la Tesis****Título:** Los exo-oncomiRNA inducidos por TWEAK pueden predecir la agresividad del cáncer de próstata. Caracterización funcional**Autores:** Antonio Altuna-Coy; Xavier Ruiz-Plazas; Marta Alves; Joan Francesc García Fontgivell; Salomé Martínez; José Segarra; Matilde Rodríguez Chacón**Tipo de participación:** Comunicación Oral**Fecha:** 05/11/2020**Congreso:** IV Congreso Nacional Jóvenes Investigadores en Biomedicina (ConBioPreVal).**Título:** sTWEAK levels are associated with prostate cancer patient's metabolic status and modulates lipid metabolism in vitro.**Autores:** Altuna-Coy, A.; Ruiz-Plazas, X.; Alves-Santiago, M.; Joan Francesc García Fontgivell; Salomé Martínez Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R.**Tipo de participación:** Póster (0133-R-P)**Fecha:** 19/07/2021 – 22/07/2021**Congreso:** 43th Annual Congress of SEBBM.**Título:** Liquid biopsy-based exo-miRNAs can predict prostate cancer aggressiveness**Autores:** Antonio Altuna-Coy, Xavier Ruiz-Plazas, Marta Alves-Santiago, Joan Francesc García-Fontgivell, Salomé Martínez-González, José Segarra-Tomás, Matilde R. Chacón.**Tipo de participación:** Comunicación Oral**Fecha:** 18/11/2021**Congreso:** GEIVEX/TeNTaCLES 2021 Minisymposium**Título:** Periprostatic adipose tissue exomicroRNA profile in prostate cancer patients with different degree of aggressiveness.**Autores:** Sílvia Sánchez-Martin; Antonio Altuna-Coy; Xavier Ruiz-Plazas; José Segarra-Tomás; Helena Ascaso-Til; Marta Alves-Santiago; Manuel Prados-Saavedra; Joan Francesc García-Fontgivell; Xana Bernal-Escoté; Matilde R. Chacón.**Tipo de participación:** Poster (PS03.02)**Fecha:** 25/05/2022 – 29/05/2022**Congreso:** ISEV Annual Meeting 2022 (Lyon, Francia)**Título:** Differential profile analysis of microRNAs in exosomes from prostate cancer cells. Target prediction.**Autores:** Antonio Altuna-Coy; Sílvia Sanchez-Martin; Marina Mendieta-Homs; Xavier Ruiz-Plazas; José Segarra-Tomás; Helena Ascaso-Til; Marta Alves-Santiago; Manuel Prados-Saavedra; Matilde R. Chacón.**Tipo de participación:** Poster (PS03.11)**Fecha:** 25/05/2022 – 29/05/2022**Congreso:** ISEV Annual Meeting 2022 (Lyon, Francia)



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**