



El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

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.

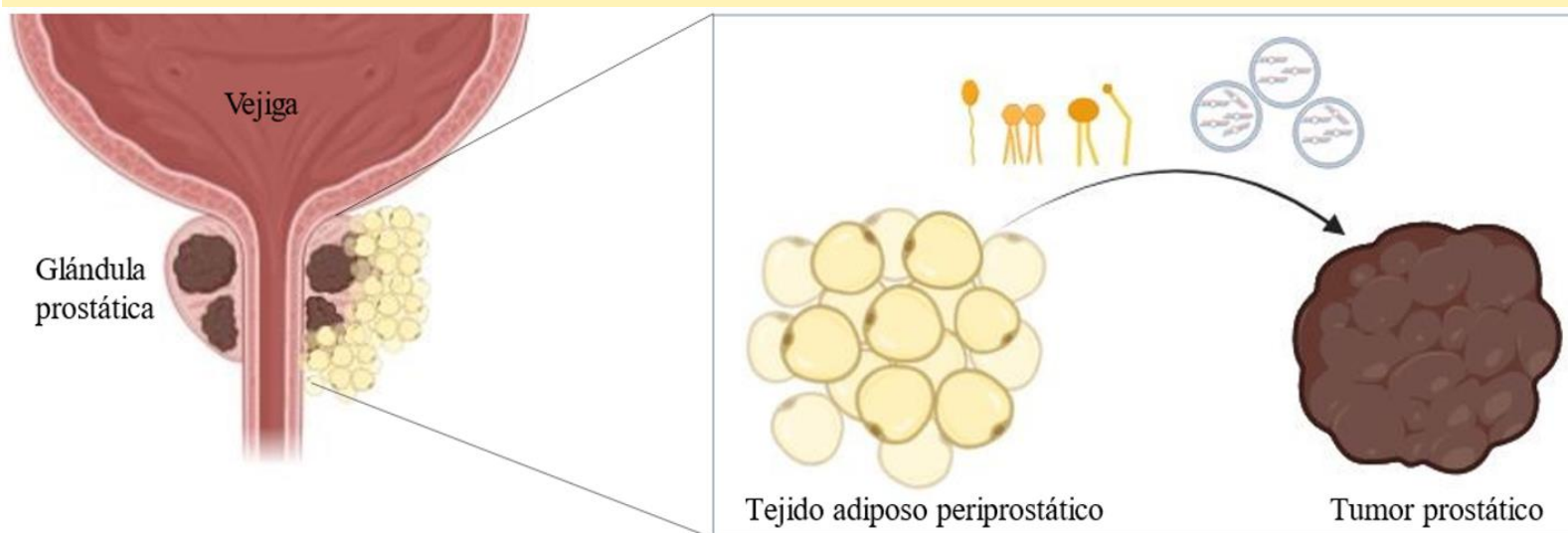
WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 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

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN



TESIS DOCTORAL

2024

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

Silvia Sánchez Martín

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

TESIS DOCTORAL

Dirigida por

Dra. Matilde Rodríguez Chacón y el Dr. Xavier Ruiz Plazas



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, 2024

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN



Departamento de Ciencias Médicas Básicas

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

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat “El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata”, que presenta Silvia Sánchez Martín 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 “El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata”, que presenta Silvia Sánchez Martín 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 “El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata”, presented by Silvia Sánchez Martín 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 22 de agosto de 2024

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

Dra. Matilde Rodríguez Chacón

Dr. Xavier Ruiz Plazas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

“Un viaje de mil millas comienza con un primer paso”

Lao-Tse

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

Agradecimientos

Al concluir esta etapa tan significativa en lo profesional y personal, quiero dedicar unas palabras a todas las personas que, de una u otra manera, han sido importantes y fundamentales en este proceso.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis. A la Dra. Matilde Rodríguez Chacón, quien ha sido una guía constante, contribuyendo con su experiencia en la investigación y su esfuerzo incansable. Al Dr. Xavier Ruiz Plazas, por su visión clínica, su perspectiva ha sido esencial para comprender mejor el impacto de nuestro trabajo en la aplicación práctica. Gracias a ambos por la dedicación.

Sin duda, este logro no habría sido posible sin la inspiración y el apoyo de mis padres, pilares de la familia numerosa Sánchez Martín. No hay suficientes palabras para expresar mi gratitud por haberme brindado una base emocional sólida esencial para mi desarrollo, así como por ofrecerme el respaldo económico necesario en mis estudios. Gracias por inculcarme el valor del esfuerzo constante, la capacidad de resolver desafíos con determinación y la resiliencia para superar cualquier adversidad. A mis hermanos, mis abuelas...a toda mi familia en general, aunque la distancia nos haya separado físicamente, os he sentido y os he tenido presentes en cada paso de este camino.

Quiero agradecer profundamente a mi refugio, mi pareja, quien, sin dudarlo, se mudó conmigo para emprender esta aventura en tierras catalanas. Hemos compartido la experiencia, emoción e ilusión de muchas “primeras veces” con los recuerdos imborrables que ello conlleva. También hemos enfrentado juntos la soledad y los problemas que se nos han presentado. Somos equipo. *T'estimo molt.*

También valorar y destacar el cariño, apoyo y disposición que he recibido por parte de sus padres, sus tios, su abuela y Lidia, mi confidente.

A mis amigas, aunque la distancia y las responsabilidades nos mantengan separadas durante largos períodos, cada reencuentro es como si el tiempo no hubiera pasado. Larga vida a las charlas sanadoras sin importar el cómo, el cuándo ni el dónde. Gracias por ser siempre ese refugio de normalidad y alegría que tanto necesito. Siempre nos quedarán los audios infinitos de WhatsApp para ponernos al día.

Finalmente, y no menos importante, quiero incluir a todos los compañeros del IISPV con quien he tenido el gusto de coincidir, por todo lo aportado y enseñado. “Equipo croquetón”, gracias por hacer más llevadero el día a día, la compañía y las risas han sido un bálsamo en medio de la rutina diaria. Os deseo lo mejor.

A todos y cada uno de vosotros, gracias de corazón, puedo considerarme una doctora en biomedicina muy afortunada.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

Índice

RESUMEN	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIACIONES	7
I. INTRODUCCIÓN	15
1. Aspectos generales del cáncer de próstata (CaP)	15
1.1 Epidemiología, incidencia y factores de riesgo	15
1.2 Anatomía y alteraciones de la próstata	15
1.3 Diagnóstico del CaP	16
1.3.1 Antígeno prostático sérico (PSA)	16
1.3.2 Clasificación Tumor-Nódulo-Metástasis	17
1.3.3 <i>Gleason Score</i>	18
1.3.4 Clasificación pronóstica del tumor	19
1.4 Biomarcadores del CaP	20
1.5 Tratamiento del CaP	22
1.5.1 Tratamientos hormonales	22
1.5.2 Prostatectomía radical	23
1.5.3 Radioterapia	23
1.5.4 Tratamientos focales	24
1.6 Vigilancia activa	24
1.7 Modelos para el estudio del CaP en el laboratorio	24
1.7.1 Modelos <i>in vitro</i>	24
1.7.2 Modelos <i>in vivo</i>	25
2. Reprogramación metabólica en el CaP	26
2.1 Metabolismo lipídico en el CaP	28
2.1.1 Captación y almacenamiento de ácidos grasos	28
2.1.2 Lipogénesis	28
2.1.3 Elongación de ácidos grasos	29
2.1.4 Lipólisis	29
3. Microambiente tumoral	31
3.1 Microambiente tumoral del CaP	32
4. Tejido adiposo	34
4.1 Tipos y composición del tejido adiposo	34
4.2 Obesidad y cáncer	36
4.3 Tejido adiposo peritumoral	38
4.3.1 Tumores estrechamente relacionados con el tejido adiposo peritumoral	38
5. Tejido adiposo periprostático y CaP	43
5.1 Asociación entre el tejido adiposo periprostático y la agresividad en CaP	43
5.1.1 Grosor/cantidad del tejido adiposo periprostático	45
5.1.2 Tejido adiposo periprostático y obesidad	46
5.2 Transcriptómica del tejido adiposo periprostático	47
5.3 Lipidómica del tejido adiposo periprostático	48
6. Vesículas extracelulares y cáncer	49

6.1	Clasificación, métodos de aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares.....	50
6.2	Internalización de vesículas extracelulares por células diana	52
6.3	Composición de las vesículas extracelulares	52
6.3.1	Proteínas.....	53
6.3.2	Lípidos	53
6.3.3	Ácidos nucleicos	53
6.4	Vesículas extracelulares en el lenguaje cruzado cáncer-estroma y efectos sobre el tumor ■	54
6.4.1	Lenguaje cruzado CaP-estroma mediante vesículas extracelulares.....	56
6.5	Vesículas extracelulares como biomarcadores y terapia en cáncer.....	58
6.5.1	Vesículas extracelulares para el diagnóstico y tratamiento del CaP.....	59
7.	ExomicroARNs y cáncer	60
7.1	Biogénesis y empaquetamiento de los miARNs	61
7.2	Herramientas de predicción de dianas de miARNs	62
7.3	ExomicroARNs y su participación en el desarrollo del cáncer	62
7.3.1	ExomicroARNs y CaP	64
7.4	Aplicaciones clínicas de los exomicroARNs: diagnóstico, pronóstico del cáncer y abordaje terapéutico	65
7.4.1	Aplicaciones clínicas de los exomicroARNs en el CaP	66
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	70
III.	RESULTADOS	73
	<i>The lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue reveals alterations in tumor cell's metabolic crosstalk.....</i>	74
	<i>Tumoral periprostatic adipose tissue exovesicles-derived miR-20a-5p regulates prostate cancer cell proliferation and inflammation through the RORA gene</i>	99
IV.	DISCUSIÓN	128
	<i>Impacto metabólico del TAPP en la agresividad del CaP</i>	129
	<i>Impacto epigenético de los exomiARNs contenidos en las VEs secretadas por el TAPP en la agresividad del CaP</i>	137
V.	CONCLUSIONES	146
VI.	BIBLIOGRAFÍA	149
VII.	PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DURANTE LA TESIS DOCTORAL	185

Resumen

Justificación

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más frecuente en el mundo y la quinta causa de muerte por cáncer en los hombres. La principal problemática 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 dado que el biomarcador de uso actual que es el antígeno prostático sérico (PSA), a pesar de disminuir significativamente la mortalidad desde su descubrimiento en los años 90, no es específico de CaP, produciéndose sobrediagnósticos que conllevan sobretratamientos a pacientes con tumores indolentes con los efectos secundarios asociados.

Por tanto, se necesitan nuevos biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico relacionados con procesos patológicos del CaP capaces de distinguir tumores indolentes de los agresivos y que permitan ayudar en las decisiones médicas.

En la última década, el interés por el microambiente tumoral ha ido en aumento. Puesto que algunos tipos de cáncer se desarrollan en las proximidades del tejido adiposo (TA), el tejido adiposo peritumoral (TAP) ha recibido particular interés en tumores como el de hígado, ovario, páncreas, colon y mama.

En el presente trabajo pretendemos estudiar cómo el tejido adiposo periprostático (TAPP), como componente del microambiente tumoral en contacto con el CaP, puede influir en la agresividad del CaP a través de cambios en la reprogramación metabólica del tumor y mediante la regulación epigenética de genes tumorales mediante exomiARNs contenidos en vesículas extracelulares (VEs) secretadas por el TAPP; información que podría contemplarse para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Metodología

En el primer estudio, aplicamos la técnica de lipidómica no dirigida con la finalidad de caracterizar los lípidos en el TAPP de 40 pacientes con CaP (n = 20 con bajo riesgo y n = 20 con alto riesgo) mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis de éster metílico de AG (FAME) y cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) para el análisis de acilcarnitinas y lipidómico. Respecto al análisis lipidómico, utilizamos dos plataformas: LIP-I para analizar extractos de tejido metanólico y LIP-II para extractos de tejido con cloroformo/metanol. Se utilizaron los análisis PLS-DA (*partial least squares-discriminant*) y VIP (*variable importance in projection*) para identificar lípidos con capacidad pronóstica del CaP, y se realizó una aproximación funcional mediante *MetaboAnalyst* del conjunto de metabolitos para detectar alteraciones en vías metabólicas. La interacción metabólica entre el TAPP y las líneas celulares (PC-3 y LNCaP) se estudió mediante experimentos *ex vivo*. Se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

(RT-qPCR) la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos (*SREBP1*, Proteína de unión al elemento de respuesta al Estero1; *FASN*, Ácido graso sintasa; *ACACA*, Acetil-CoA Carboxilasa; *LIPE*, Lipasa E, tipo sensible a hormonas; *PPARG*, Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas; *CD36*, Clúster de diferenciación 36; *PNPLA2*, Triacilglicerol lipasa; *FABP4*, Proteína de unión a ácidos grasos; *CPT1A*, Carnitina palmitoiltransferasa I α ; *FATP5*, Familia de portadores de solutos 27 Miembro 5; *ADIPOQ*, Adiponectina), marcadores inflamatorios (*IL-6*, *IL-1B*, Interleuquina 6 y 1B; *TNF α* , Factor de necrosis tumoral alfa) y marcadores relacionados con tumores (*ESRRA*, Receptor alfa relacionado con el estrógeno; *MMP-9*, Metaloproteinasas de la matriz extracelular 9; *TWIST1*, Factor de transcripción BHLH 1 de la familia Twist). Se midió la captación y acumulación de lípidos por parte de las células de CaP.

En el segundo estudio, se utilizaron un total de 24 muestras de TAPP humano y tejido adiposo perivesical emparejado (TAPV). Se aislaron por afinidad bioquímica las VEs secretadas por explantes de TAPP al medio de cultivo tras 24 horas de incubación. Las VEs de TAPP se caracterizaron mediante *Western Blot* y microscopía electrónica de transmisión. La captación de VEs de TAPP por las células de CaP se verificó mediante microscopía confocal. El contenido de exomiARNs de las VEs también se aisló por afinidad bioquímica y se analizó el perfil de expresión en *microarrays*. Se realizaron análisis *in silico* en busca de posibles genes dianas de los exomiARNs desregulados de las VEs de TAPP vs TAPV mediante *miRNet* y las vías de interacción de dichos genes mediante *Reactome*. Se revelaron las redes de interacción proteína-proteína de los genes diana de los exomiARNs mediante *STRING*. Se utilizó tejido humano prostático tumoral y no tumoral parafinado y la base de datos *CancerMIRNome* para analizar la expresión de los genes diana y de los miARNs seleccionados por *StarMir*. Se realizaron estudios funcionales *in vitro* utilizando líneas celulares de CaP (RWPE-1 y 22Rv1) para determinar el control epigenético funcional de los miARNs sobre los genes diana mediante el uso de inhibidores de miARNs y silenciadores de genes diana.

Resultados

En el primer estudio, observamos mediante el análisis de la composición de ácidos grasos (AG) totales del TAPP de pacientes con CaP de alto riesgo, que la concentración de AG monoinsaturados (MUFA) era significativamente mayor al compararlos con los de bajo riesgo. Además, poseían una cantidad significativamente mayor de lisofosfatidilinositol y una cantidad significativamente menor de AG poliinsaturados omega 6 (PUFA ω -6). Se identificaron diferencias significativas en el contenido de 67 especies de lípidos en las muestras de TAPP de CaP de alto vs a las de bajo riesgo. Los análisis PLS-DA y VIP revelaron un panel lipídico de 16 metabolitos discriminatorio entre los pacientes con CaP de bajo y alto riesgo, lo que sugiere un metabolismo lipídico alterado en el TAPP relacionados con la agresividad del CaP. Se determinó que el 12,13-epoxioctadecenoico (12,13-EpOME) y el monoglicérido (18:0) eran factores independientes de la agresividad del CaP. El análisis funcional

reveló que las alteraciones en la biosíntesis de AG, el metabolismo del ácido linoleico y la β -oxidación de AG de cadena muy larga están alterados en el lipidoma del TAPP de los tumores de alto riesgo. Los análisis de la expresión de genes de muestras de TAPP asociados con la síntesis *de novo* de AG, como *FASN* y *ACACA*, determinó que estaban menos expresados en el TAPP de CaP de alto riesgo vs bajo riesgo, mientras que los genes asociados con la inflamación (*IL-6*, *IL-1B* y *TNF α*) estaban sobreexpresados. El co-cultivo de explantes de TAPP con líneas celulares de CaP reveló una expresión reducida de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos (*CD36*, *FASN*, *PPARG* y *CPT1A*), contrariamente a lo observado en líneas celulares de CaP co-cultivadas. Además, observamos un incremento en la absorción y acumulación de lípidos en las células de CaP tras el co-cultivo. La expresión de genes relacionados con agresividad tumoral estaban sobreexpresados en las líneas celulares de CaP tras el co-cultivo con TAPP.

En el segundo estudio, comprobamos que el TAPP secretaba VEs mediante la técnica del *Western blot* y la microscopía de transmisión de electrones. Estas técnicas revelaron las características de las VEs derivadas de muestras de TAPP: visualización de una bicapa lipídica característica de las VEs, un diámetro que oscilaba entre 30 y 200 nm, propio de VEs medianas-grandes y la presencia de marcadores de superficie típicos de VEs como las proteínas transmembrana multipaso CD9 y CD81 (tetraspaninas) y la proteína citosólica de choque térmico HSP70. Las VEs de TAPP se incorporaron a las células de CaP, visualizadas en el citoplasma. Nueve exomiARNs estaban diferencialmente sobreexpresados en las muestras de TAPP vs TAPV. El gen *RORA* (*RAR Related Orphan Receptor A*) se identificó como gen diana común de los 9 exomiARNs desregulados y tras los análisis *in silico*, se reveló su implicación en la activación de la expresión de genes nucleares, mitocondriales y relacionados con el ritmo circadiano. El análisis de redes de proteínas, relacionó la proteína RORA con proteínas implicadas en el ciclo circadiano; la hipoxia; la angiogénesis; la metástasis; transformación y progresión tumoral; el crecimiento celular; la diferenciación de células T; y la diferenciación, inflamación y apoptosis. Comprobamos que el gen *RORA* estaba menos expresado en tejido tumoral en comparación con tejido no tumoral, y los miARNs seleccionados estaban sobreexpresados en muestras de CaP tumoral vs no tumoral. El análisis funcional *in vitro* reveló que el miR-20a-5p regulaba epigenéticamente al gen *RORA* implicado en inflamación y proliferación de células de CaP.

Conclusión general

El TAPP, como componente del microambiente tumoral en contacto con las células de CaP, está implicado en progresión del tumor ya que altera su metabolismo lipídico y los exomiARNs de las VEs secretadas por el TAPP regulan epigenéticamente la expresión de genes implicados en la inflamación y proliferación del tumor.

Índice de figuras

- Figura 1** Ilustración de la anatomía de la próstata
- Figura 2** Ilustración de la evolución hacia el CaP desde estados premalignos iniciales
- Figura 3** Histopatología del *Gleason Score*
- Figura 4** Esquema general del metabolismo celular en CaP *in vivo*
- Figura 5** Resumen del recorrido metabólico de los AGs en las células de CaP
- Figura 6** Escenario general del microambiente tumoral con las células y estructuras especializadas que lo componen
- Figura 7** Interacciones en el microambiente tumoral en el contexto del CaP
- Figura 8** Distribución principal del tejido adiposo blanco y del tejido adiposo marron en humanos adultos
- Figura 9** Heterogeneidad celular característica del tejido adiposo: adipocitos y fracción estroma-vascular
- Figura 10** Relación entre la obesidad y el riesgo asociado con el desarrollo de cáncer, su recurrencia y mortalidad
- Figura 11** Papel oncogénico general del tejido adiposo peritumoral
- Figura 12** Ubicación del CaP y el tejido adiposo periprostático
- Figura 13** Heterogeneidad de las VEs
- Figura 14** Composición y cargo de las VEs
- Figura 15** Esquema modelo de la interacción miARN con su ARNm diana

Índice de tablas

Tabla 1	Clasificación TNM
Tabla 2	Grado de CaP según ISUP con su correspondiente puntuación de Gleason y las características histopatológicas asociadas
Tabla 3	Clasificación D'Amico para predecir la recidiva bioquímica post-PR
Tabla 4	Clasificación EAU para realizar subgrupos de pronóstico de pacientes
Tabla 5	Clasificación CPG para predecir la mortalidad en CaP no metastásico
Tabla 6	Descripción de nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico postulados para su uso rutinario del CaP
Tabla 7	Líneas celulares más usadas en investigación en el estudio del CaP
Tabla 8	Modelos de ratones que se utilizan habitualmente en estudios <i>in vivo</i> en el context del CaP
Tabla 9	Compuestos propuestos para tratar el CaP en el contexto del metabolismo lipídico
Tabla 10	Mecanismos moleculares involucrados y efectos del TAP sobre algunos tipos de cáncer
Tabla 11	Clasificación de las VEs
Tabla 12	Categorías de marcadores que deben analizarse para demostrar la presencia de VEs
Tabla 13	Funciones de las VEs en la comunicación cruzada entre el cáncer y el estroma y vías implicadas en el/los efecto/s que supone para el tumor
Tabla 14	Funciones de las VEs en la comunicación cruzada entre el cáncer de próstata y el estroma y vías implicadas en el/los efecto/s que supone para el tumor
Tabla 15	VEs como biomarcadores en fluidos corporales humanos en diferentes tipos de cáncer
Tabla 16	ExomiARNs de varias fuentes celulares relacionados con diversos procesos cancerígenos en diferentes tipos de tumor
Tabla 17	ExomiARNs relacionados con procesos proliferativos, invasivos y metastásicos, de modulación del sistema inmune y de respuesta a tratamiento en el contexto del CaP
Tabla 18	Ejemplos de exomiARNs con utilidad pronóstica y/o diagnóstica en diferentes tumores
Tabla 19	Ensayos clínicos de miARNs como terapia contra el cáncer
Tabla 20	Estudios clínicos que exploran exomiARNs como posibles biomarcadores del CaP
Tabla 21	Estudios clínicos que exploran miARNs útiles para terapia en CaP

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

Abreviaciones

ACACA/ACC	Acetil-CoA Carboxilasa
ACLY	ATP Citrato Liasa
ADAM10	Dominio 10 de Metalopeptidasa
ADI/ADIPOQ	Adiponectina
ADMSC	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
ADNn	Ácido Desoxirribonucleico nuclear
ADNv	Ácido Desoxirribonucleico viral
ADP	Adenosina Difosfato
AG	Ácidos grasos
AGO1	Componente catalítico Argonauta RISC 1
AGO3	Componente catalítico Argonauta RISC 3
AKT	Proteína quinasa B
ALIX	Proteína de interacción 6 de muerte celular programada
AMACR	Alfa-metilacil-CoA Racemasa
AMPK	Subunidad catalítica alfa 1 activada por AMP de proteína quinasa
ANGPT1	Angiopoyetina 1
ANXA	Anexinas
APAF1	Factor activador de peptidasa apoptótica 1
APC	Regulador APC de la vía de señalización Wnt
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNc	Ácido Ribonucleico circular
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNmt	Ácido Ribonucleico mitocondrial
ARNnc	Ácido Ribonucleico no Codificante
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ARNsc	Ácido Ribonucleico condicional pequeño
ARNsn	Ácido Ribonucleico nuclear pequeño
ARNsno	Ácido Ribonucleico pequeño nucleolar
ARNts	Ácido Ribonucleico pequeño derivado de transferencia
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
ARMMs	Microvesículas mediadas por la proteína 1 que contienen el dominio de arrestina
ARRDC1	Proteína 1 que contienen el dominio de arrestina
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATP	Adenosin Trifosfato
ATX	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2
A-SMA	Actina del músculo liso alfa
BARF1	Proteína secretada por el virus de Epstein-Barr recombinante
BATF	<i>Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor</i>
BAX	BCL2 asociado a X regulador de apoptosis
BCL	Regulador de Apoptosis BCL
BMAL1	<i>Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1</i>
BRCA1	<i>BRCA1 DNA Repair Associated</i>
BRCA2	<i>BRCA2 DNA Repair Associated</i>

CAA	Adipocitos asociados al cáncer o residentes en el tumor
CAMs	Moléculas de adhesión celular
CaP	Cáncer de próstata
CAV	Caveolinas
CCL7	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 7</i>
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CD8+	Células T citotóxicas
CD	Clúster de diferenciación
CDH2	Cadherina 2
CDKN1B	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B
CDK6	Quinasa 6 dependiente de ciclina
CEBPα	CCAAT Proteína de unión potenciadora alfa
CFH	Complemento factor H
CFHR1	Complemento factor H relacionado 1
CK5	Queratina 5
CLS	<i>Crown like structure</i>
CLOCK	Regulador del reloj circadiano
CMA	Células mesenquimales derivadas del tejido adiposo
COLGALT2	Procolágeno galactosiltransferasa 2
COLIA2	Cadena de colágeno tipo I alfa 2
COL1A1	Cadena alfa 1 de colágeno tipo I
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CPT1A	Carnitina palmitoiltransferasa I α
CREB	Unión de elementos de respuesta cAMP
CTSA	Catepsina A
CX43	Proteína Gap Junction Alfa 1
CYSLR2	Receptor 2 de cisteinil leucotrienos
DGAT1	Diacilglicerol O-aciltransferasa 1
DGCR8	Gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge
DIL	Digestión lisosomal
DLX1	Homeobox 1 sin distal
dPSA	Densidad del PSA
DRAM1	Modulador de autofagia regulado por Daños en el ADN 1
EAU	Asociación Europea de Urología
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELOVL	Ácidos grasos de cadena muy larga
EMMPRIN	Inductor de metaloproteinasa de matriz extracelular
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EpCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales
EphA4	Receptor EPH A4
ERG	Factor de Transcripción ETS ERG
ERK	Proteína quinasa 1 activada por mitógenos
ESCRT	Complejos de clasificación endosómica necesarios para la maquinaria de transporte
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica
ESRRA	Receptor alfa relacionado con el estrógeno
exomiARNs	microARNs contenidos en vesículas extracelulares

FABP4	Proteína de unión a ácidos grasos
FAC	Fibroblastos asociados a cáncer
FADD	Fas asociado a través del dominio de muerte
FADH2	Flavín adenín dinucleótido
FAME	Análisis de éster metílico de ácidos grasos
FAO	Ácido graso oxidasa
FASN	Ácido graso sintasa
FATP5	Familia de portadores de solutos 27 Miembro 5
FCG	Fibras colágenas
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FEV	Fracción estromal-vascular
FFAR2	Receptor de ácidos grasos libres 2
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FLOT	Flotilinas
FOXA1	Factor de transcripción 1
FSP	Proteína específica de fibroblasto
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GATA3	Proteína de unión a GATA 3
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
GDF15	Factor de diferenciación de crecimiento 15
GNA	Proteínas G heterotriméricas
GOLM1	Proteína 1 de la membrana de Golgi
GPC1	Glicpcano 1
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GREM1	Gremlin 1 Antagonista de BMP de la Familia DAN
GSTP1	Glutation S-Transferasa Pi 1
GTP	Guanosina trifosfato
GTPasas	Trifosfatasas de guanosina
HAUS1	<i>HAUS Augmin Like Complex Subunit 1</i>
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
HDAC3	Histona deacetilasa 3
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HGF1	Fibroblasto gingival humano -1
HIFU	Ultrasonido focalizado de alta intensidad
HIF-2α	Proteína 1 del Dominio PAS Endotelial
Hk2	Hexoquinasa 2
HMGCR	3-Hidroxi-3-Metilglutaril-CoA Reductasa
HOTAIR	<i>HOX Transcript Antisense RNA</i>
hsa	<i>Homo sapiens</i>
HSL	Hormona sensible a lipasas
HSP	Proteínas de choque térmico
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN-γ	Interferón gamma
IGFR1	Receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGFBP-2	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina-2
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
ING5	Inhibidor del crecimiento miembro de la familia 5
INHBA	Inhibina subunidad beta A
ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
ITGA	Integrinas

JAK	Janus kinasa
JNK	Quinasa c-jun n-terminal
KAT5	Lisina acetiltransferasa 5
KISS1	Supresor de metástasis KiSS-1
KRAS	Protooncogén KRAS, GTPasa
KRAS G12D	Mutación Protooncogén KRAS, GTPasa
LAMP-2	Glicoproteínas de membrana asociadas a lisosomas
LARP4B	La Ribonucleoproteína 4B
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
lncARN	Ácido ribonucleico de cadena larga no codificante
LEP	Leptina
LIPE	Lipasa E, tipo sensible a hormonas
LRG1	Alfa-2-glicoproteína 1 rica en leucina
MAGE3/6	Antígeno 3 asociado al melanoma
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MALAT-1	Transcripción 1 del adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MARCO	Receptor de macrófagos con estructura colágena
MARK1	<i>Microtubule Affinity Regulating Kinase 1</i>
mCPRC	Cáncer de próstata resistencia a la castración metastásico
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos de quimioquinas
MEG3	<i>Maternally expressed 3</i>
METTL7A	Proteína similar a la metiltransferasa 7A
MFGE8	<i>Milk Fat Globule EGF And Factor V/VIII Domain Containing</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
miARNs	microARNs en tejidos o circulación
MIRLET7A2	microARN Let-7a-2
MM	Mieloma múltiple
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
mpMRI	Resonancia magnética multiparamétrica
MSC	Células madre mesenquimales/estromales
MS4A1	Membrana que abarca 4 dominios A1
mTor	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>
MUFA	Ácidos grasos de cadena larga monoliinsaturados
MVBs	Cuerpos multivesiculares
MYC	Protooncogen MYC, factor de transcripción BHLH
NAA35	N-Alfa-Acetiltransferasa 35, Subunidad Auxiliar NatC
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
ND	No datos
NF-κB	Cadenas ligeras kappa de las Células B activadas
NOX5	NADPH Oxidasa 5
NPAS2	Proteína 2 del dominio PAS neuronal
NPY1R	Neuropéptido Y Receptor Y1
NPY5R	Neuropéptido Y Receptor Y5
NR1F1	Subfamilia de receptores nucleares 1 Grupo F Miembro 1
NRIP1	Nuclear Receptor Interacting Protein 1
NT5E	5'nucleotidasa CD73 anclada a GPI

NK	<i>Células Natural Killer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACT	Activador de proteínas de la proteína quinasa inducida por interferón
PAI-1	Miembro 1 de la familia E de Serpin
PAP	Fosfatasa ácida prostática
PARPi	Inhibidores de la poli ADP-ribosa polimerasa
PCA3	Antígeno de cáncer de próstata 3
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PD-1	Muerte celular programada 1
PE	Fosfatidiletanolamina
PGE2	Prostaglandina E2
PHI	<i>Prostate health index</i>
PIA	Atrofia inflamatoria proliferativa
PIM-2	Protooncogén Pim-2
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5 bisfosfato 3-quinasa
PKM	Enzima glucolítica piruvato kinasa
PLCB1	Fosfolipasa C Beta 1
PLOD2	Procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2
PLS-DA	<i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis score plot</i>
PNG	Proteínas no colágenas
PNPLA2	Triacilglicerol lipasa
PPARγ/PPARG	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas
PPAT	Tejido adiposo periprostático
PR	Prostatectomía radical
pre-miRNA	microRNA premaduro
PS	Fosfatidilserina
PSA	Antígeno prostático sérico
PSMA	Antígeno prostático específico de membrana
PSP	Proteína secretora de próstata
PSs	Portadores de soluto
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
p21	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1a
Ras	Miembro de la superfamilia Ras de proteínas G monoméricas
RAASF1	Miembro 1 de la familia de dominios de la asociación Ras
RBC	Recuento de glóbulos rojos
RBMS1	<i>RNA Binding Motif Single Stranded Interacting Protein 1</i>
RET	Protooncogén Ret
RIP1	Receptor que interactúa con serina/treonina quinasa 1
RM	Resonancia magnética
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROCK1	<i>Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1</i>
ROR	Receptor del ácido retinoico
RORA	<i>RAR Related Orphan Receptor A</i>
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RUNX3	Factor de transcripción familiar RUNX 3
SCD	Estearoil-CoA desaturasa

SDCBP	Sintetina
SDHB	Subunidad B del complejo succinato deshidrogenasa hierro azufre
SFA	Ácidos grasos saturados
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SIRT6	Sirtuina 6
SIK2	<i>Salt Inducible Kinase 2</i>
SLC1A5	Transportadores de aminoácidos neutros dependientes de sodio
SLC45A3	Proteína asociada al cáncer de próstata6/P501S/prosteina
Smad4	Miembro de la familia SMAD 4
SNAIL	Represor transcripcional de la familia Snail
SOX	<i>SRY-box transcription factor</i>
SREBP1	Proteína de unión al elemento de respuesta al Esterol 1
SRP-ARN	ARN de la partícula de reconocimiento de señal
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TA	Tejido adiposo
TAP	Tejido adiposo peritumoral
TAPP	Tejido adiposo periprostático
TAPV	Tejido adiposo perivesical
TC	Tomografía computarizada
TCA	Ciclo del Ácido Tricarboxílico
TCGA-PRAD	<i>The Cancer Genome Atlas Prostate Adenocarcinoma</i>
TDA	Terapia de privación de andrógenos
TFR2	Receptor de transferrina
TG	Triacilglicerol
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th-1	Linfocitos T auxiliares 1
TIMP	Inhibidor de metalopeptidasa
TLR4	<i>Toll Like Receptor 4</i>
TMC	Transportadores de monocarboxilato
TMPRSS2	Serina Proteasa 2 transmembrana
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNM	Tumor-Nódulo-Metástasis
TNRC6A	Gen 6A que contiene repeticiones de trinucleótidos
TNRC6B	Gen 6B que contiene repeticiones de trinucleótidos
TPBG	Glicoproteína del trofoblasto
TP53INP1	<i>Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1</i>
TRAMP	Adenocarcinoma transgénico de próstata de ratón
TRBP	Subunidad TARBP2 del complejo de carga RISC
Treg	Células T reguladoras
TRUS	Ultrasonografía transrectal
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
TSPAN	Tetraspanina
uPa	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
VA	Vigilancia activa
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VEs	Vesículas extracelulares
VEs-TAPP	Vesículas extracelulares aisladas de tejido adiposo periprostático
VEs-TAPV	Vesículas extracelulares aisladas de tejido adiposo perivesical

VHL	Supresor de tumores de Von Hippel-Lindau
VIM	Vimentina
VIP	<i>Variable Importance in Projection</i>
VPP	Vía de las Pentosas Fosfato
XAF1	Factor 1 Asociado a XIAP
Y-ARN	Ácido Ribonucleico pequeño no codificante
Zeb1	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>
ZNF	<i>Zinc Finger Proteins</i>
12,13-EpOME	12,13-epoxioctadecenoico

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

I. Introducción

1. Aspectos generales del cáncer de próstata (CaP)

1.1 Epidemiología, incidencia y factores de riesgo

El cáncer de próstata (CaP) es la neoplasia maligna más común entre los hombres y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer en los países occidentales. Se ha estimado que 1,6 millones de hombres son diagnosticados de CaP y 366.000 mueren a causa de éste cada año en todo el mundo (1). En España, al igual que en otros países occidentales, la incidencia ha aumentado notablemente desde principios de los años 90 a causa de la introducción y generalización del uso del antígeno prostático específico (PSA) y del aumento de la esperanza de vida con su consiguiente mayor diagnóstico, y la existencia de más y mejores métodos diagnósticos (2).

Varios factores de riesgo se asocian con el desarrollo del CaP como la edad (pico de incidencia a los 70 años), la raza (3), los antecedentes familiares, los factores genéticos como mutaciones en los genes *BRCA1 DNA Repair Associated (BRCA1)* y *BRCA2 DNA Repair Associated (BRCA2)*, factores epigenéticos como modificaciones en la metilación del DNA o deacetilaciones en las histonas (4), los factores ambientales (5), la dieta (6), la infección por patógenos sexuales (7) y la inmunosupresión en pacientes trasplantados (8) entre otros.

1.2 Anatomía y alteraciones de la próstata

La próstata es un órgano glandular situado por debajo de la vejiga que está compuesto por acinos epiteliales dispuestos en una red fibromuscular. Las glándulas prostáticas son las encargadas de sintetizar el líquido prostático (que representa el 30% del volumen total del semen).

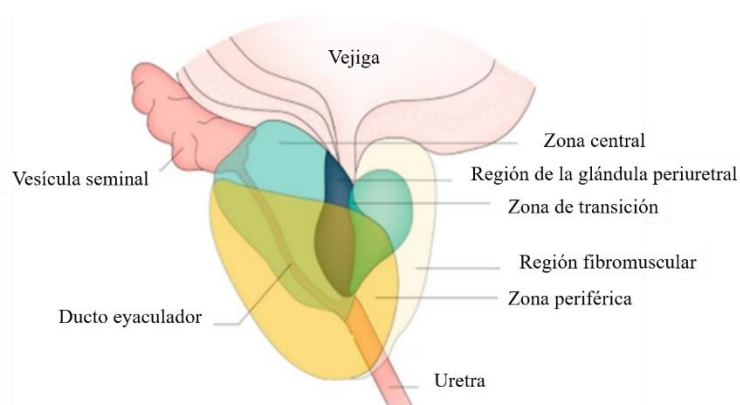


Figura 1. Ilustración de la anatomía de la próstata. Adaptada de Rebello, R. *et al.*, 2021 (10).

La próstata se compone de tres zonas diferenciadas: la central que contiene el tubo ductal desde la vesícula seminal hasta su encuentro con la uretra descendente, la periférica que se sitúa en la parte posterior de la glándula (inicio del CaP en un 70-75% de los casos) y la de transición que rodea la uretra de transición (9) (Figura 1).

Las neoplasias premalignas de la próstata incluyen la atrofia inflamatoria proliferativa (PIA), la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y la prostatitis recurrente (Figura 2) (11). El PIN es la principal lesión (12), en la cual se produce una hiperplasia de las células luminales y es bioquímica, genética y fenotípicamente similar al CaP, pero no se altera la membrana basal (13). Por otra parte, este órgano puede sufrir un agrandamiento anormal denominado hiperplasia benigna de próstata (HBP) que no

produce CaP y afecta exclusivamente a la zona de transición y provoca la constricción de la uretra descendente con retención urinaria y molestias (14).

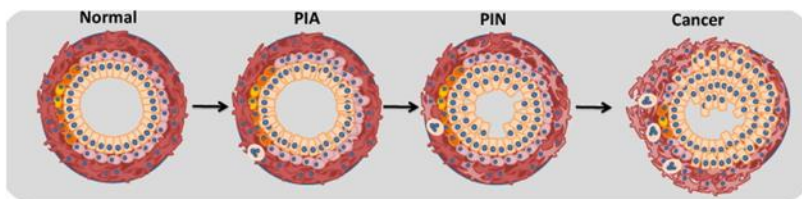


Figura 2. Ilustración de la evolución hacia el CaP desde estados premalignos iniciales. Adaptada de Packer, J.R. *et al.*, 2016 (11).

1.3 Diagnóstico del CaP

La sospecha clínica del CaP se establece tras un tacto rectal sospechoso y/o una elevación del PSA en sangre. Aunque la biopsia prostática ecodirigida sistemática continúa siendo el método de referencia para su diagnóstico, la resonancia magnética multiparamétrica (mpMRI) se considera el mejor método de imagen en la identificación del CaP clínicamente significativo y ha permitido desarrollar una modalidad de biopsia prostática dirigida a la lesión descrita en la resonancia. En este sentido, la detección precoz de CaP está evolucionando hacia la mpMRI previa a la biopsia reduciendo las biopsias innecesarias y la sobredetección de CaP insignificante, así como aumentando la detección de tumores clínicamente significativos. Por otro lado, la Asociación Europea de Urología (EAU) propone calculadoras de riesgo como herramientas eficaces para individualizar el riesgo del CaP (15,16). A pesar de todo, estas calculadoras o nomogramas presentan limitaciones importantes. En este sentido, estudios recientes ponen de manifiesto que los pacientes diagnosticados con CaP tienden a ser sobretratados dada la falta de biomarcadores predictivos específicos (17).

1.3.1 Antígeno Prostático Específico (PSA)

El PSA es una proteasa sérica que se expresa en las células epiteliales de la próstata y es secretado al líquido seminal, donde interviene en su licuefacción. Es el biomarcador más conocido para el CaP desde que fue aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) para el diagnóstico de CaP junto con el examen rectal digital en 1994 (18). Tradicionalmente el punto de corte para definir una prueba como positiva ha sido de 4 ng/ml en sangre (10,19) aunque los niveles pueden variar según otros parámetros clínicos como la edad del paciente y el tamaño prostático (20). Gracias al PSA, la mayoría de los diagnósticos de CaP son en fases tempranas de la enfermedad (más del 90% de los tumores prostáticos están localizados al momento del diagnóstico frente al 65% a comienzos de los años 90). Es este uno de los motivos, por lo que, en la actualidad, se ha conseguido disminuir la mortalidad del CaP (21).

Como contrapunto, es importante remarcar que el PSA no es una proteína específica de CaP, sino del tejido prostático, por lo que puede estar aumentado en diferentes patologías benignas como la prostatitis, la HBP y las infecciones del tracto urinario (20). Debido a esta inespecificidad para tumores

clínicamente significativos, el PSA reduce la mortalidad a expensas del sobrediagnóstico, que se cifra en hasta un 53% (22), acompañado de unos riesgos derivados de complicaciones en las biopsias (infección o sangrado) y a un posible sobretratamiento, con las consiguientes complicaciones asociadas como la disfunción eréctil y la incontinencia urinaria (23).

Con el fin de mejorar esta baja especificidad, están disponibles algunas estrategias para disminuir biopsias negativas y diagnóstico de tumores indolentes o que no ponen en riesgo la vida del paciente. En este sentido, en la decisión sobre la necesidad de realizar o no una biopsia prostática, es de gran ayuda para el urólogo el uso de nomogramas o calculadoras (disponibles por ejemplo en: <https://www.prostatecancer-riskcalculator.com/seven-prostate-cancer-risk-calculators> y <http://myprostatecancerrisk.com/>), la mpMRI como se ha comentado en el apartado 1.3 (24), la densidad del PSA (dPSA) que ajusta los valores de PSA para el volumen de la próstata (requiere una resonancia magnética o una ecografía transrectal y cuanto mayor es el valor, mayor es la sospecha de la presencia de CaP) (25), el nivel de PSA en sangre a lo largo del tiempo denominado velocidad de PSA (un incremento en los niveles de PSA > 0.75 ng/mL anuales, es indicativo de sospecha de CaP) (25) y el ratio PSA libre/PSA total en sangre (supone un riesgo mayor de cáncer cuanto más bajo sea el resultado) (26).

En relación a cuando solicitar un PSA, se han postulado una serie de recomendaciones según la guía de práctica clínica para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del CaP de la ESMO (Sociedad Europea de Oncología Médica) entre las que se encuentran (27):

- La prueba temprana de PSA (PSA inicial seguida de un seguimiento adaptado al riesgo) se puede ofrecer a hombres > 50 años, hombres > 45 años con antecedentes familiares de CaP, afroamericanos > 45 años y portadores de *BRCA1/2* > 40 años
- La prueba de CaP en asintomáticos no debe realizarse en hombres con una esperanza de vida <10 años (16)

1.3.2 Clasificación Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM)

La clasificación TNM trata de determinar la etapa tumoral mediante la extensión tumoral. Para ello se basa en el tamaño del tumor primario y la afectación de la próstata (T) proporcionada por el tacto rectal, si existe una afectación de los ganglios linfáticos cercanos a la próstata (N) y la presencia de metástasis en otros órganos del organismo (M) (28). En la Tabla 1 se detalla la clasificación del TMN en el contexto del CaP.

Clasificación T: Tumor primario	
Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1: Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante imágenes	
T1a	Descubrimiento histológico accidental del tumor en ≤5% del tejido reseado
T1b	Descubrimiento histológico accidental del tumor en ≥5% del tejido reseado
T1c	Tumor identificado por biopsia con aguja debido a elevación de PSA

T2: Tumor confinado a la próstata	
T2a	El tumor afecta a la mitad de un lóbulo o menos
T2b	El tumor afecta a más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos
T2c	El tumor afecta a ambos lóbulos
T3: Tumor que se extiende más allá de la cápsula protática	
T3a	Extensión extracapsular (unilateral o bilateral)
T3b	Invasión de vesículas seminales
T4	Invasión de estructuras adyacentes distintas a las vesículas seminales
Clasificación N: Ganglios linfáticos regionales	
Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe metástasis ganglionar linfática regional
N1	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) regional(es)
Clasificación M: Metástasis a distancia	
Mx	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1: Metástasis a distancia	
M1a	Metástasis ganglionares no regionales
M1b	Metástasis óseas
M1c	Metástasis en otras localizaciones

Tabla 1. Clasificación TNM. Fuente: Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Witterkind C. TNM Classification of Malignant Tumours. 8th ed. Union for International Cancer Control. 2016. 1-272 p.

1.3.3 Gleason Score

Actualmente no existen marcadores que puedan diferenciar los tumores indolentes de los malignos mejor que el sistema histopatológico descrito por Donald Gleason en 1966 extendido durante años desde su recomendación respaldada por la OMS (Organización Mundial de la Salud). Esta clasificación aprobada por la *International Society of Urological Pathology* (ISUP) (29) que se detalla en la Figura 3, se basa en asignar a la biopsia prostática una puntuación basada en criterios morfológicos de la arquitectura tisular que reflejan el grado de diferenciación glandular desde 1 (tumor bien diferenciado) a 5 (indiferenciado).

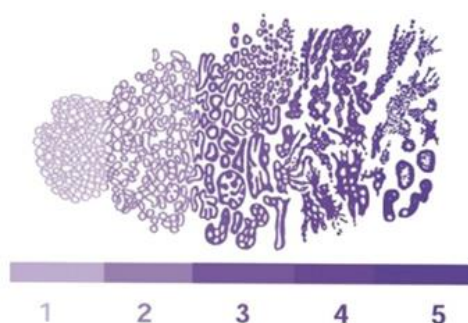


Figura 3. Histopatología del *Gleason Score*.

Adaptada de Harnden, P. *et al.*, 2007 (30).

Como consecuencia de la heterogeneidad interna de estos tumores, el grado Gleason se obtiene de la suma de la puntuación de los dos patrones celulares más representativos. Así, el resultado final oscila en un intervalo del 2 al 10. Los Gleason 4 y 5 son indistinguibles, posiblemente debido a la heterogeneidad, mientras que existe una clara separación de los Gleason 3 y 4 (11). En base a esto, se ha publicado sobre el impacto del grado histológico en la supervivencia de los pacientes

con CaP. En este sentido, sabemos que la mortalidad de cáncer específica a 15 años en pacientes con

CaP no tratados con intención curativa es mucho mayor en pacientes con un Gleason elevado (42-70 % para Gleason 8-10) que en tumores menos agresivos (6-11% para Gleason 6) (31).

En la Tabla 2 se muestra el grado de cáncer según ISUP con su correspondiente puntuación de Gleason.

Grado ISUP 1 (Gleason ≤ 6)	
Glándulas individuales y bien diferenciadas	
Grado ISUP 2 (Gleason=7)	
3+4	Glándulas mayormente formadas, pero se observan algunas glándulas fusionadas o cribiformes
Grado ISUP 3 (Gleason=7 u 8)	
4+3	Glándulas mayormente fusionadas o cribiformes, pero se observan algunas glándulas formadas
4+4	Se observan solamente glándulas fusionadas o cribiformes
Grado ISUP 4 (Gleason=8)	
3+5	Glándulas mayormente formadas, pero se observan componentes no glandulares
5+3	Apenas se observan glándulas, pero aún se ve alguna formada
Grado ISUP 5 (Gleason=9 o 10)	
4+5/5+4/5+5	Formación de necrosis y no se observan glándulas prostáticas

Tabla 2. Grado de CaP según ISUP con su correspondiente puntuación de Gleason y las características histopatológicas asociadas. Fuente: Epstein, J.I. *et al.*, 2016 (29).

1.3.4 Clasificación pronóstica del tumor

Existen múltiples clasificaciones y nomogramas basadas en datos clínicos e histológicos que ayudan a predecir la evolución del tumor para así poder definir una mejor estrategia terapéutica (pronóstico). He aquí algunos ejemplos:

- Grupos de riesgo D'Amico: publicada en 1998, clasifica a los pacientes según el estadio clínico (TNM), el grado Gleason de la biopsia y el PSA sérico (Tabla 3). Predice el riesgo de recidiva bioquímica tras el tratamiento radical en tumores clínicamente localizados en la próstata (32)

Clasificación D'Amico	
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 3. Clasificación D'Amico para predecir la recidiva bioquímica post-PR. Fuente: D'Amico, A.v. *et al.*, 1998 (32).

- Grupos de riesgo de la Asociación Europea de Urología (EAU): para la recurrencia bioquímica del CaP localizado y localmente avanzado tras una prostatectomía radical (PR) (Tabla 4) (33)

Clasificación EAU		
Low-risk	T1c-2a* y Gleason < 7 (Grado ISUP 1) y niveles de PSA en sangre < 10 ng/ml	Localizado
Intermediate-risk	T2b*	
	Gleason = 7 (Grado ISUP 2/3) Niveles de PSA en sangre entre 10 y 20 ng/ml	
High-risk	T2c*	Localmente avanzado
	Gleason > 7 (Grado ISUP 4/5) PSA > 20 ng/mL	
	T3-4* o N+**, cualquier PSA, cualquier Gleason	

Tabla 4. Clasificación EAU para realizar subgrupos de pronóstico de pacientes. *Basado en el tacto rectal. **Basado en tomografía computarizada/exploración ósea. Fuente: Cooperberg, M.R. et al., 2005 (33).

- Grupos de riesgo de la NCCN (*The National Comprehensive Cancer Network*): subdividen la enfermedad en riesgo bajo (T1-T2a, puntuación de Gleason ≤ 6 y PSA < 10 ng/ml), riesgo intermedio (T2b-T2c o puntuación de Gleason 7 o PSA 10-20 ng ml⁻¹), riesgo alto (T3a o puntuación de Gleason 8-10 o PSA > 20 ng ml⁻¹), riesgo muy alto de CaP localmente avanzado (T3b-T4 o patrón de Gleason primario 5 o > 5 núcleos con puntuación de Gleason 8-10) y riesgo metastásico (N1 o M1 con cualquier estadio T) (34,35)
- Evaluación del riesgo de cáncer de próstata de la Universidad de California de San Francisco (CAPRA): determina el riesgo de recurrencia después del tratamiento del CaP según el Gleason, el nivel de PSA, el estadio clínico y la edad del paciente al momento del diagnóstico. Asigna puntos a cada uno de estos factores y cuanto mayor sea la suma, mayor será el riesgo de recurrencia (33)
- Clasificación del grupo pronóstico Cambridge (CPG): predictor de la mortalidad específica para el CaP no metastásico basado en cinco niveles (Tabla 5). Según el Instituto Nacional para la Excelencia en la Salud y la Atención (NICE) es una forma más precisa para evaluar el cáncer de próstata que el clásico sistema de tres grupos (36)

Clasificación CPG	
1	T1/T2 y Gleason 6 y PSA en sangre < 10 ng/ml
2	T1/T2 y Gleason 3+4=7
	T1/T2 y PSA en sangre entre 10 y 20 ng/ml
3	T1/T2 y Gleason 3+4=7 y PSA en sangre entre 10 y 20 ng/ml
	T1/T2 y Gleason 4+3=7
4	T3
	Gleason 8
	PSA en sangre > 20 ng/ml
5	Alguna combinación de: Gleason 8, T3 o PSA > 20 ng/ml
	T4 Gleason 9-10

Tabla 5. Clasificación CPG para predecir la mortalidad en CaP no metastásico. Fuente: Parry, M.G. et al., 2020 (36).

1.4 Biomarcadores del CaP

Un biomarcador es "una característica definida que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas a una exposición o intervención" y pueden ser de diagnóstico (detectan o confirman la presencia de una enfermedad o condición de interés), de pronóstico (ayudan a decidir la estrategia terapéutica del paciente según la probabilidad de recurrencia o progresión) o predictivos (predicen la evolución de la enfermedad tras un tratamiento concreto) (37).

A pesar de que todos los parámetros descritos anteriormente para el diagnóstico del CaP permiten cierta estratificación del riesgo, no permiten establecer un pronóstico individual definitivo del paciente (38) por lo que los especialistas del campo uro-oncológico han puesto de manifiesto la necesidad de encontrar biomarcadores que ayuden en la toma de decisiones en situaciones clínicas desafiantes (39). En este sentido, se han postulado diferentes biomarcadores séricos, urinarios y tisulares. Los biomarcadores de diagnóstico buscan disminuir biopsias innecesarias y sobretratamientos y aumentar el diagnóstico de tumores prostáticos que pongan en riesgo la vida del paciente. En este sentido, algunos biomarcadores están indicados para la consideración de una biopsia inicial (*4K score*, el *Prostate health index*: PHI, el *SelectMDx*, el *ExoDx prostate intelliscore*, el *My prostate score urine test*) y otros para la repetición de la biopsia (*PCA3* y *ConfirmMD*). Los biomarcadores de pronóstico ayudan a identificar pacientes que requerirán tratamiento adicional después de la terapia inicial y los más destacables son *Decipher*, *OncotypeDX genomic prostate score* y *Prolaris*.

En la Tabla 6 se han recopilado biomarcadores de diagnóstico y pronóstico del CaP descritos en la literatura. Cabe destacar que la mayoría de ellos aún están por validar.

	Nombre del biomarcador	Utilidad/funcionalidad
		Genes/proteínas/enzimas
Biomarcadores de diagnóstico	SLC45A3 (40)	Se expresa en CaP negativo para PSA Diferencia metástasis de CaP de otros tumores por IH Se expresa débilmente en CaP agresivos
	PSMA (41)	Se sobreexpresa en metástasis
	PAP (42)	Detecta metástasis
	NKXH3.1 (43)	Detecta CaP metastásico pobremente diferenciado
	p63 (44)	No se expresa en CaP acinar de tipo habitual
	ERG (45)	Se expresa en la mitad de adenocarcinomas prostáticos
	Citoqueratina 5 (46)	Descarta el CaP con mayor precisión junto con AMACR y PSA
	Citoqueratina 6 (47)	Detección CaP problemáticos mediante tinción negativa junto con la de CK5- y AMACR+
	Calicreína 2 (48)	Licuefacción del plasma seminal y activación del PSA
	PHI® (49)	Aumenta especificidad PSA mediante 3 subformas: la total, la libre y [-2] proPSA
	<i>4K score</i> (50,51)	Incluye PSA total, PSA libre, PSA intacto y Hk2; y los combina con la edad y los hallazgos de tacto rectal. También existe una combinación de PHI® y 4K score
	<i>SelectMDx</i> ® (52)	Combina DLX1 y HOXC6 en orina post tacto rectal con el PSA total, la edad, la historia de la biopsia de próstata y la historia familiar
	<i>ConfirmMDx</i> ® (53)	Analiza el estado de metilación de GSTP1, APC y RASSF1
	<i>Prostate Cancer Antigen 3</i> (54)	Mide PCA3 (aumentada en CaP) en la orina de primera evacuación y post tacto rectal

	<i>My prostate score urine test</i> (55)	Detecta la fusión de TMPRSS2 y ERG (ocurre en el 50% de CaP)
	<i>ExoDx® prostate intelliscore</i> (56)	Firma genética basada en exosomas a partir de la expresión de mRNA en orina
Biomarcadores de pronóstico	Genes/proteínas/enzimas	
	AMACR (57)	La sobreexpresión por IH indica un mal pronóstico y probabilidad de metástasis ósea asociado con un Gleason alto y niveles iniciales altos de PSA
	PTEN (58)	Supresor de tumores. La pérdida es un biomarcador IH emergente
	Sintasa de ácidos grasos (59)	La sobreexpresión en IH se relaciona con aumento en la puntuación de Gleason y tumores más agresivos
	FOXA1 (60)	Las mutaciones en el análisis IH se vincula con tipos de cáncer más agresivos y resistentes a la castración Predictor independiente de recurrencia
	PSP (61)	Disminuye a medida que el CaP progresa a un estado independiente de hormonas
	VEGFA (62)	Elevado en formas agresivas y se correlaciona con la clasificación del cáncer
	p27 KIP1 (63)	La disminución se asocia con un mal pronóstico
	Paneles/kits	
	<i>OncotypeDX genomic prostate score®</i> (64)	Selecciona candidatos para la vigilancia activa mediante 12 genes involucrados en procesos tumorales + 5 genes de referencia
<i>Prolaris®</i> (65)	Se basa en una puntuación consecutiva tras el estudio de 31 genes relacionados con la regulación del ciclo celular	
<i>ProMark®</i> (66)	Plataforma proteómica de 12 biomarcadores	
<i>Decipher</i> (67)	Predice la progresión tras el tratamiento definitivo mediante el uso de 22 genes involucrados en procesos tumorales	

Tabla 6. Descripción de nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico postulados para su uso rutinario del CaP. **Abreviaciones:** AMACR, Alfa-metilacil-CoA Racemasa; APC, Regulador APC de la vía de señalización Wnt; CK5, Queratina 5; DLX1, Homeobox 1 sin distal; ERG, Factor de transcripción ETS ERG; FOXA1, Factor de transcripción 1; GSTP1, Glutathion S-Transferasa Pi 1; HOXC6, Homeobox C6; Hk2, Hexoquinasa 2; IH, Inmunohistoquímica; PAP, Fosfatasa ácida prostática; PCA3, Antígeno de cáncer de próstata 3; PSMA, Antígeno prostático específico de membrana; PSP, Proteína secretora de próstata; PTEN, Homólogo de fosfatasa y tensina; RASSF1, Miembro 1 de la familia de dominios de la asociación Ras; SLC45A3, Proteína asociada al cáncer de próstata6/P501S/prosteína; TMPRSS2, Serina proteasa 2 transmembrana; VEGFA, Factor de crecimiento endotelial vascular A.

1.5 Tratamiento del CaP

Una vez finalizada la fase diagnóstica y caracterizado el tipo de tumor, se decide el tratamiento según las características de éste, la expectativa de vida del paciente y sus preferencias particulares.

Atendiendo a lo mencionado, los tratamientos más habituales que se ofrece al paciente con CaP son los desarrollados a continuación.

1.5.1 Tratamientos hormonales

El eje de señalización de andrógenos desempeña un papel fundamental en la patogénesis del CaP, a raíz de las investigaciones de Huggins y Hodges en 1941 (68) quienes vieron que la administración de testosterona aumentaba el crecimiento de la próstata en modelos animales y que la castración de los

pacientes reducía en gran medida los niveles de testosterona, lo que provocaba la regresión de la enfermedad avanzada. Aquí se originó el desarrollo de la terapia de privación de andrógenos (TDA) indicado como tratamiento para los pacientes con CaP metastásico, la cual tiene como objetivo reducir los niveles de andrógenos en el cuerpo. Sin embargo, esto trae consigo muchos efectos secundarios como la disfunción eréctil y los sofocos entre muchos otros y fracasa casi inevitablemente a largo plazo porque el tumor entra en una fase de independencia a los andrógenos, es decir de resistencia a la castración (CPRC), y puede seguir proliferando (69).

En cuanto a los pacientes con CaP localizado, actualmente, la TDA en monoterapia no se considera tratamiento de referencia y su indicación se ha limitado para: CaP de alto riesgo y localmente avanzado, pacientes que no desean o no pueden recibir tratamiento local, los que tienen un PSA-DT (tiempo que transcurre para que el PSA doble su valor) < 12 meses y un PSA > 50 ng/mL, un tumor poco diferenciado o síntomas locales molestos relacionados con la enfermedad local.

La TDA también se utiliza como neoadyuvante después de la radioterapia en pacientes de alto riesgo para mejorar su eficacia (10).

Estas son algunas de las opciones de TDA aplicadas a pacientes con CaP (70):

- Extirpación quirúrgica de los testículos (orquiectomía): reduce la testosterona sérica en 12 horas con una rápida reducción de la carga tumoral, atrofia glandular e involución prostática. Además, induce la detención del ciclo celular epitelial y la progresión hacia la independencia a los andrógenos
- Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (como la leuprolida): induce efectos similares a la orquiectomía, pero la testosterona disminuye más lentamente
- Antagonistas de la hormona luteinizante (como el degarelix): provocan en la mayoría de los pacientes una disminución de testosterona a nivel de castración al tercer día

1.5.2 Prostatectomía radical

La prostatectomía radical (PR) se lleva a cabo en pacientes con CaP localizado y consiste en la extirpación total de la próstata y las vesículas seminales (27) que puede provocar disfunción eréctil e incontinencia de orina, como efectos secundarios más destacables (71). La cirugía está indicada en pacientes con una expectativa de vida mayor a 10 años (72).

1.5.3 Radioterapia

Puede ser externa, dentro o cerca de la zona que requiere tratamiento (braquiterapia). Consiste en irradiar las células tumorales mediante isótopos radiactivos para destruir el tumor. Puede ser de manera directa incidiendo en el ADN y/o ARN (Ácido Ribonucleico) o indirectamente mediante la producción de radicales libres (9). Se ofrece a los pacientes con tumores localizados o localmente avanzado con una expectativa de vida mayor a 10 años (72).

1.5.4 Tratamientos focales

Son técnicas mínimamente invasivas que destruyen tumores pequeños limitando el daño al tejido circundante ya que permiten un acceso directo y dirigido a la glándula. Las técnicas principales son la crioterapia y el ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU). Los resultados preliminares de los estudios actuales demuestran escasos efectos secundarios y buenos resultados oncológicos. La biopsia junto con la RMN se utiliza para el seguimiento de estos pacientes (73).

1.6 Vigilancia activa

La vigilancia activa (VA) es una observación indicada en pacientes con expectativa de vida > a 10 años que implica exámenes de seguimiento programados y predefinidos mediante el examen rectal digital, la medición del PSA y la repetición de la biopsia, y se emplea para reducir el sobretratamiento en hombres con CaP clínicamente localizado de muy bajo riesgo evitando los efectos secundarios derivados de los tratamientos radicales (74).

1.7 Modelos para el estudio del CaP en el laboratorio

1.7.1 Modelos *in vitro*

Las líneas celulares son amplia y comúnmente utilizadas como modelos de cáncer, siendo útiles para reproducir, predecir y comprender los mecanismos biológicos y aprender cómo los tumores son propensos a responder a los nuevos medicamentos. En general, las líneas celulares de cáncer derivadas del paciente albergan la mayor parte de los mismos cambios genéticos que se encuentran en los tumores de los pacientes y sólo un 7% de las 614 líneas celulares estudiadas en una publicación del 2020 (entre las que se encuentran de CaP), se parecían mucho a un tipo de cáncer distinto del cual teóricamente procede (82).

Con objetivo de comprender la patogenia molecular del CaP, se han desarrollado varios modelos celulares derivados principalmente de biopsias de pacientes que difieren en su origen (puede surgir de una o de varias fuentes de células), la expresión del AR, PSA y 5- α reductasa entre otras características (75).

En la Tabla 7 aparecen listadas las líneas celulares de uso habitual en el laboratorio indicadas para la investigación en el contexto del CaP que reproducen la condición sana (epitelio prostático no tumoral), el CaP dependiente de andrógenos y el CaP independiente de andrógenos.

Tipo	Línea celular	Origen	Expresión de PSA	Expresión de AR
Epitelio prostático no tumoral	pRNS-1-1	PR inmortalizada con el plásmido pRSV-T	No	Sí
	RWPE-1	Células epiteliales de la zona periférica inmortalizadas con virus del papiloma humano 18	Sí	Sí

Epitelio prostático no tumoral	BPH1	Células epiteliales de una muestra transuretral de HBP	No	No
	PIN	Lesión PIN humana de alto grado inmortalizada con virus del papiloma humano 18	Sí	No reportado
	PNT1A	Células epiteliales prostáticas sanas por transfección con SV40	Sí	Sí
Dependientes de andrógenos	RWPE-2	RWPE-1 transformadas mediante el uso del virus del sarcoma murino Kirsten	Sí	Sí
	LNCaP	Células epiteliales aisladas en nódulo linfático	Sí	Sí
	LAPC-4	Nódulo linfático con resistencia a andrógenos	Sí	Sí
	LAPC-9	Metástasis en fémur bajo tratamiento de privación de hormonas	Sí	Sí
	VCaP	Metástasis vertebral	Sí	Sí
	MDA PCa 2a/2b	Metástasis ósea (dos áreas diferentes)	Sí	Sí
	LuCaP 22Rv1	Metástasis de nódulo linfático e hígado	Sí	Sí
Independientes de andrógenos	ARCaP	Ascitos aspirados de metástasis ósea	Sí	Sí
	PC-3	Metástasis ósea	No	No
	DU-145	Metástasis en cerebro	No	No

Tabla 7. Líneas celulares más usadas en investigación en el estudio del CaP. Adaptado de Cunningham *et al*, 2015 (75).

1.7.2 Modelos *in vivo*

El modelo animal más utilizado desde hace décadas para la investigación del CaP es el ratón y lo más común es la creación de xenoinjertos derivados de líneas celulares o de pacientes (extracción de una porción de tumor humano e inserción directa en el ratón bajo la piel o en el mismo órgano afectado) o el uso de ratones inducidos químicamente y modificados genéticamente (76). Esta ingeniería genética ha proporcionado información importante sobre los mecanismos moleculares del CaP. Sin embargo, a la hora de establecer cualquier paralelismo entre humano y ratón, hay que tener muy presente que el entorno del tejido de ratón es heterólogo, que carece de un sistema inmunitario endógeno y que el CaP no se desarrolla naturalmente en estos animales (13).

También en modelos de pez cebra, algunas líneas celulares como C4-2B, DU-145 y PC3-CTR se han empleado como xenoinjertos para estudiar funciones de microARNs (76).

En la Tabla 8 se muestran los modelos de ratón *in vivo* más usados en el contexto del CaP.

Modelo	Alteraciones genéticas	Estudio de metástasis
Pten	Escisión de la secuencia codificante de Pten para favorecer 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 una alta expresión de c-myc con capacidad de respuesta a los andrógenos	No
Lo Myc	Inducción de una baja expresión de c-myc	No

LADY	Deleciones en promotores que permiten estudiar el inicio y la progresión del tumor	Nódulos linfáticos, hígado y pulmón
MPAKT	Estudio de AKT en la transformación de las células epiteliales prostáticas	No

Tabla 8. Modelos de ratones que se utilizan habitualmente en estudios *in vivo* en el contexto del CaP. Adaptado de Cunningham *et al.*, 2015 (13). **Abreviaciones:** **AKT**, Proteína quinasa B; **Pten**, Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; **TRAMP**, *Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate*.

2. Reprogramación metabólica en el CaP

El metabolismo celular involucra procesos bioquímicos complejos a través de los cuales se consumen nutrientes específicos. Los carbohidratos, ácidos grasos (AG) y aminoácidos son el componente principal de procesos como la glucólisis, la fosforilación oxidativa a través del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), la glucogenólisis, la lipogénesis y el ciclo de la urea (77). Lo que sucede en las células cancerosas es una desregulación de estas vías metabólicas con el fin de facilitar la supervivencia, proliferación y metástasis en un microambiente inicialmente desfavorable que puede ser hipóxico, ácido y deficiente en nutrientes (78,79). El metabolismo de un tumor depende de factores como el tejido de origen, el microambiente tumoral, el nivel de hipoxia, etc (77). Por ejemplo, en el glioblastoma, se oxidan grandes cantidades de glucosa y se generan altas concentraciones de glutamina mientras que en el adenocarcinoma pancreático el metabolismo proteico es característico y la captación de glutamina es preferencial sobre la glucosa o el lactato (80).

El primer ejemplo acerca de esta reconfiguración metabólica fue descrito por Otto Warburg, el “Efecto Warburg”, que describe como las células malignas cambian su ruta dominante de producción de ATP (adenosín trifosfato) por fosforilación oxidativa a glucólisis aeróbica. Esta evidencia se basó en la observación de la proliferación elevada de las células tumorales de ascitis por un aumento del consumo de glucosa (convertida en lactato incluso en presencia de abundante oxígeno). La rápida captación y metabolismo de la glucosa permite que las células alimenten varias vías no mitocondriales, como la vía de las pentosas fosfato (produce ribosa para los nucleótidos y NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) para la biosíntesis reductora)), y la vía de la hexosamina (glicosilación de proteínas y síntesis de glicerol para la producción de lípidos complejos) (81,82). El efecto Warburg podría ser consecuencia de un daño en las mitocondrias debido al cáncer, una adaptación al ambiente bajo en oxígeno o el resultado de que los genes cancerosos inhiben las mitocondrias debido al rol que desempeñan estas en la apoptosis.

En concreto, el metabolismo de las células prostáticas exhibe perfiles únicos y distintos durante las diferentes etapas del CaP ya que la captación de glucosa no parece aumentar de forma temprana pero sí parece estar involucrada en la progresión de la enfermedad y la división celular. Es decir, las células de CaP inicialmente no obedecen al fenotipo clásico del efecto Warburg comentado, sino que muestra una disminuida tasa de captación y oxidación glucídica (razón por la cual una tomografía de emisión de

positrones con glucosa marcada no es útil para este tipo de cáncer) (80). Sin embargo, los fibroblastos estromales adyacentes a las células cancerosas epiteliales sí responden al efecto Warburg secretando lactato que se convierte en piruvato y es utilizado en las mitocondrias por las células tumorales en el TCA, promoviendo así la producción eficiente de energía (ATP a través de la fosforilación oxidativa), lo que resulta en una mayor capacidad proliferativa, dando lugar al llamado efecto Warburg inverso (83).

En la próstata, 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, hace posible mantener los niveles elevados de citrato (componente clave del fluido prostático) (84,85). En el CaP, se produce un cambio metabólico maligno que restablece un TCA y convierte las células prostáticas productoras de citrato a oxidantes de este (85). A través de este cambio metabólico fenotípico y energéticamente más favorable, el citrato se utiliza para la fosforilación oxidativa y procesos biosintéticos como la lipogénesis como puede observarse en la Figura 4.

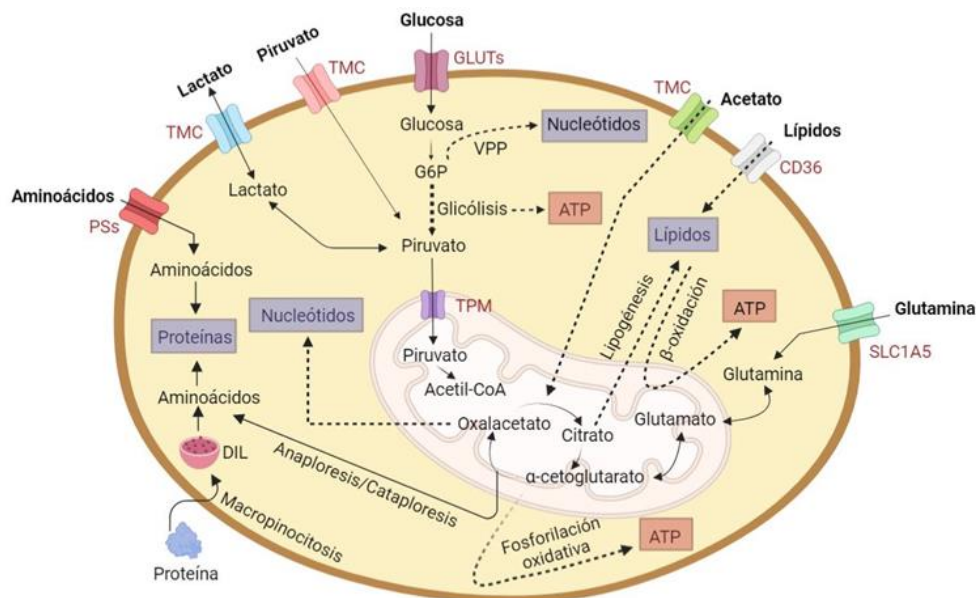


Figura 4. Esquema general del metabolismo celular en CaP *in vivo*. En el CaP, se adquieren y asimilan una amplia gama de sustratos exógenos para permitir la formación y el crecimiento del tumor. La función mitocondrial es necesaria para la viabilidad del cáncer ya que el ciclo de Krebs, que tiene lugar en la matriz mitocondrial, proporciona citrato para generar ATP mediante la lipogénesis y posterior β -oxidación o mediante la fosforilación oxidativa. Las flechas continuas representan pasos metabólicos únicos y las flechas discontinuas representan procesos simplificados de varios pasos. Adaptada de Bader, D. *et al.*, 2020 (80). Creado con Biorender.com. **Abreviaciones:** CD36, Cluster de diferenciación 36; DIL, Digestión lisosomal; GLUTs, Transportadores de glucosa; PSS, Portadores de soluto; SLC1A5, Transportadores de aminoácidos neutros dependientes de sodio; TMC, Transportadores de monocarboxilato; TPM, Transportador de piruvato mitocondrial; VPP, Vía de las pentosas fosfato.

2.1. Metabolismo lipídico en el CaP

La reprogramación del metabolismo de los lípidos y AG en las células tumorales prostáticas es un campo bastante nuevo relacionado directamente con la patogénesis. Las desregulaciones producidas son necesarias para cumplir con los requisitos energéticos y sintéticos del tumor en crecimiento (estructura básica de las membranas, modificación postraduccional de las moléculas de señalización...etc) e incluyen un aumento en la captación y almacenamiento de AG, la lipogénesis *de novo*, la elongación de los AG y la oxidación (79,86,87). Aparte, las células de CaP también son capaces de captar otros metabolitos exógenos (como la glutamina, el lactato, el acetato o el piruvato) que participan como metabolitos intermediarios de vías lipídicas (Figura 4) (80). Por tanto, la inhibición de estos puntos clave expuestos en el metabolismo de los lípidos, podría ser una alternativa para tratar el CaP, especialmente el avanzado (86,88).

2.1.1. Captación y almacenamiento de ácidos grasos

Se ha demostrado que los AG que se encuentran almacenados en el tejido adiposo (TA) pueden ser captados por las células prostáticas con objetivo de conseguir una gran fuente externa de energía ya que los lípidos contienen un alto valor calórico, en concreto el doble de contenido energético que los aminoácidos o la glucosa (1 gramo = 38 Kilojulios) (89,90).

En el CaP, esta entrada de AG es mayor, los de cadena corta pueden transportarse directamente a través de la membrana, pero otros la atraviesan gracias a CD36 que se ha relacionado también con cambios metabólicos y se correlaciona con la agresividad del CaP (88). Otro transportador también sobreexpresado, aunque a nivel intracelular y relacionado con la agresividad y metástasis, es el FABP (Proteína de unión a ácidos grasos) (91). El responsable de la regulación de estos transportadores de AG es el PPAR γ (Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma) un factor de transcripción implicado en la síntesis de lípidos por lo que su expresión también se relaciona directamente con el CaP (92). Dependiendo del AG captado, los efectos son diferentes. Por ejemplo, el ácido oleico y el palmítico tienden a aumentar la proliferación celular (93) mientras que el exceso de palmitato lleva a la apoptosis (94). Por tanto, la concentración de varios AG podría indicar el desarrollo del CaP.

2.1.2 Lipogénesis

La lipogénesis es una vía anabólica de síntesis de AG *de novo*, que por tanto requiere energía, que es proporcionada por otras vías anteriores o acopladas como el ciclo de Krebs, la vía de la pentosa fosfato o la glucólisis en forma de poder reductor (NADH, o FADH₂ (Flavín adenín dinucleótido) y derivados)) o energía (ATP, guanosa trifosfato (GTP) y acetil Co-A (95,96)). En este sentido, energéticamente hablando, es más económico para la célula captar AG que generarlos. Sin embargo, desde 1953, se sabe que los AG circulantes en los tumores no determinan el grado en el que deben sintetizarse *de novo* para cubrir las necesidades celulares, sino que es independiente un proceso de otro, de forma que la lipogénesis en cáncer se ve aumentada sea cual sea la situación. Por consiguiente, es un proceso

metabólico clave que puede proporcionar biomarcadores y ser útil para proponer e investigar posibles tratamientos (106).

El aumento de la lipogénesis en las células tumorales va ligado a un aumento de la proliferación e invasión del CaP, y en consecuencia a una sobreexpresión de enzimas y proteínas citosólicas implicadas directamente en el proceso como son la ACLY (ATP citrato liasa que convierte el citrato que proviene del ciclo de Krebs a acetil-CoA y oxaloacetato), ACC (Acetil-CoA carboxilasa que convierte el acetil-CoA en malonil-CoA), FASN (Ácido graso sintasa que convierte el malonil-CoA y el acetil-CoA en ácido palmítico) y el factor de transcripción SREBP1 (Proteína de unión al elemento de respuesta al colesterol 1 que regula FASN y ACC) (98–101). La sobreexpresión de FASN se ha asociado con la agresividad del CaP, con la aparición de metástasis en hueso y con la supervivencia (102–105). También se ha reportado una posible participación del AR en la expresión de FASN ya que activa SREBP (86).

2.1.3 Elongación de ácidos grasos

La elongación de AG es parte de la formación de los AG. En este proceso, las desaturasas y/o elongasas modifican los AG previamente a su utilización. Estas enzimas se encuentran elevadas en el desarrollo del CaP por lo que tienen un papel clave en esta enfermedad tal y como se ha descrito, por determinar la función que llevarán a cabo los AG según su elongación (115,116).

Entre los AG de cadena larga, los poliinsaturados (PUFA) tienen múltiples funciones que pueden influir en el destino celular depende la elongación que tenga lugar ya que los PUFA $\omega 6$ tienden a acelerar la inflamación, la proliferación de células cancerosas y la metástasis, mientras que los $\omega 3$ generalmente se oponen a estos efectos (108).

Los miembros de la familia de proteínas de elongación de AG de cadena muy larga (ELOVL) son enzimas clave involucradas en este proceso de elongación de los AG. Se ha reportado que ELOVL7 está involucrado en el crecimiento del CaP, se correlaciona negativamente con la supervivencia y es importante para la síntesis de AG saturados de cadena muy larga y sus derivados y puede ser una diana prometedora para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas o preventivas para el CaP (106). Por otra parte, otro de la familia, ELOVL5, es la enzima clave para la producción de PUFA. Centenera *et al.* lo identificó como un factor metabólico protumoral en el CaP que está regulado por andrógenos y es fundamental para la metástasis y el crecimiento del CaP (107).

2.1.4 Lipólisis

Los AG se almacenan como gotas lipídicas en los adipocitos en forma de triacilglicerol (TG). Estos lípidos se movilizan durante la lipólisis de los adipocitos, el proceso fundamental de hidrolización de TG a AG. La oxidación de AG generalmente solo se asocia con su uso estructural y energético, sin embargo, también debe ubicarse en un contexto diferente: como un guardián crítico que está regulado por señales oncogénicas para impulsar el crecimiento y desarrollo del cáncer, la diabetes tipo 2 y la

enfermedad del hígado graso (109). Se ha demostrado que la oxidación de AG es importante para la activación de la vía del PPAR γ , que tiene un papel en la metástasis de CaP a través de la modulación del proceso de transición epitelial-mesenquimatoso (EMT) (110). Este proceso de lipólisis es llevado a cabo por las lipasas citosólicas, aunque estudios recientes demuestran que la lipofagia (degradación autofágica de lípidos por lipasas ácidas) es también una vía, alternativa, en el recambio de lípidos, siendo un actor crucial en el desarrollo y metástasis del tumor (88). Se ha confirmado que esta lipólisis es constante en células de CaP ya que se ha observado que las enzimas participantes como el monoacilglicerol lipasa (MAGL), la hormona sensible a lipasas (HSL) y el triacilglicerol lipasa (PNPLA2) se encuentran aumentadas y que la inhibición de dichas enzimas resulta en una disminución de procesos asociados a la génesis y progresión del CaP (111).

La principal vía de degradación de AG tiene lugar en la matriz mitocondrial, en el proceso de la β -oxidación, donde el AG se convierte en acetil-CoA generando ATP en el ciclo de Krebs. Esta energía liberada en forma de ATP es importante sobre todo en el estrés oxidativo producido en las células tumorales ya que se consigue soportar la alta demanda energética durante el transcurso de los procesos tumorales y posibilita la producción de NADPH para eliminar especies reactivas de oxígeno y proteger a las células (93). Existen evidencias experimentales que describen un aumento de la actividad de las enzimas implicadas en esta vía como son la CPT1A (carnitina palmitoiltransferasa I α) que cataliza la transferencia de AG de cadena larga a la mitocondria para una mayor oxidación o la AMACR (112,113).

En la Figura 5 se muestra un diagrama esquematizado del metabolismo de los AG en las células de CaP.

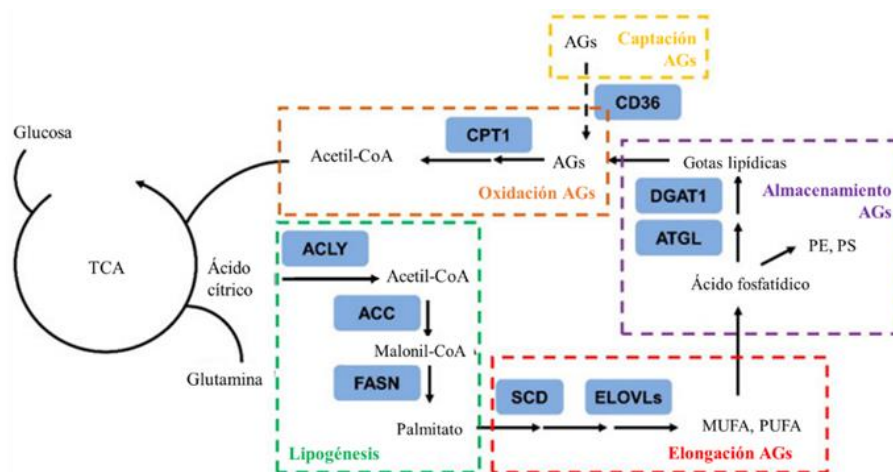


Figura 5. Resumen del recorrido metabólico de los AGs en las células de CaP. Adaptada de Huan, X. *et al.*, 2021 (86).

Abreviaciones: SCD, Esteroil-CoA Desaturasa; MUFA, Ácidos grasos de cadena larga monoliinsaturados; PE, Fosfatidiletanolamina; PS, Fosfatidilserina; ATGL, Dominio de fosfolipasa similar a patatin; DGAT1, Diacilglicerol O-aciltransferasa 1.

Poniendo en contexto la importancia de las enzimas lipogénicas y lipolíticas en el CaP, se han convertido en una estrategia anticancerígena prometedora (Tabla 9).

Compuesto	Diana	Modelo de estudio	Efecto/s	Ensayo clínico
Perhexilina (114)	CPT1A	<i>In vitro e in vivo</i>	Disminuye el crecimiento tumoral en combinación con enzalutamida	Aún no para CaP
Etoximir (115)		<i>In vitro e in vivo</i>	Reduce el crecimiento tumoral en xenoinjertos de VCaP de ratones	Fase II
Ranolazina (114)	β -oxidación	<i>In vitro e in vivo</i>	Disminuye el crecimiento tumoral en combinación con enzalutamida	Aún no para CaP
TVB-2640 (116)	FASN	<i>In vivo</i>	Suprime el crecimiento tumoral en un 15% en xenoinjertos 22Rv1 (y hasta un 97% en combinación con paclitaxel)	Fase I
IPI-9119 (117)		<i>In vitro e in vivo</i>	Actividad antitumoral en organoides humanos de mCPRC y modelos de xenoinjerto 22Rv1 y LNCaP-95	Aún no
Fatostatina (118)	SREBP	Ratón con CaP	Inhibición de la lipogénesis junto con bloqueo del crecimiento y de la metástasis	Aún no

Tabla 9. Compuestos propuestos para tratar el CaP en el contexto del metabolismo lipídico. Fuente: Gio, F. *et al.*, 2022 (119).

En cuanto a la perhexilina y la ranolazina, su uso como tratamiento está aprobado como tal para la angina, pero por su mecanismo de acción se ha propuesto que pudieran ser útiles para el CaP. Entre los compuestos que sí están en ensayos clínicos para el CaP específicamente, hay que destacar que TVB-2640 ha mostrado una tolerabilidad favorable ya sea en monoterapia o en combinación con taxano en cuatro pacientes (120) y que la fase II en la que se encontraba etoximir ha tenido que ser finalizada prematuramente dada la hepatotoxicidad causada en pacientes con insuficiencia cardíaca (121).

3. Microambiente tumoral

La biología de los tumores sólidos debe comprenderse como un conjunto de componentes celulares y acelulares (122,123) (como se puede observar en la Figura 6) dentro de un entorno que se conoce como microambiente tumoral, concepto que se remonta a 1863 (124).

Existe una asociación entre los microambientes proinflamatorios preexistentes y un mayor riesgo de cáncer (125). De hecho, el desarrollo del cáncer de mama no se da sin una previa infiltración de células inmunes en el tejido adiposo (126). Algunas de estas células tienen acción antitumoral (CD8+, Th-1 y neutrófilos) y, sin embargo, otras, favorecen la metástasis como las células T reguladoras (123,127) o promueven fenotipos inmunosupresores como las células B (123,128) y los macrófagos de fenotipo M2. Estos últimos también inducen la angiogénesis (al igual que los neutrófilos en etapas avanzadas y las células endoteliales vasculares) (3,12,126).

El sistema nervioso curiosamente también participa en el desarrollo y la metástasis de células sólidas y cánceres hematológicos (130–132). De hecho, la invasión perineural se correlaciona con un mal pronóstico en el CaP, cáncer de mama, colon y ovario (132–134).

En cuanto al denominado microambiente mecánico, depende en gran medida de componentes intracelulares, componentes extracelulares que forman la matriz extracelular (como los fibroblastos

asociados al cáncer), la integrina y células del estroma (fibroblastos y adipocitos) (135) e influye en los oncogenes o supresores de tumores, la morfología celular, la carcinogénesis del cáncer y las respuestas terapéuticas (124). En cuanto a los adipocitos, las células mesenquimales derivadas de este, promueven la progresión del cáncer al inducir inflamación y reclutamiento de células inmunes (125,136) y los adipocitos asociados al cáncer (CAA), proveen AG al tumor, estimulan a las células cancerosas para aumentar la β -oxidación de AG (125,137) y contribuyen directa o indirectamente en la proliferación, apoptosis, metabolismo, angiogénesis e invasión de las células tumorales (demostrado *in vitro* en cáncer de mama) por el incremento en la producción y liberación de algunas adipoquinas (12,29,30). Estos CAA son adipocitos desdiferenciados con abundantes mitocondrias y mayor secreción de factores inflamatorios, de crecimiento y angiogénicos (125,139).

Es evidente por tanto la importancia de las células no malignas dentro del microambiente tumoral, por lo que son dianas muy interesantes. Además, la estabilidad de su genoma hace que sea menos probable la adquisición de quimiorresistencia, hecho que sí ocurre con las células tumorales (76).

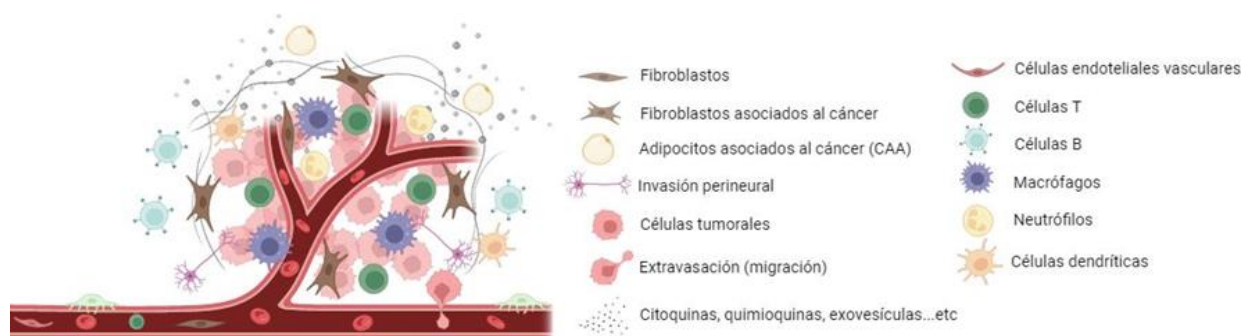


Figura 6. Escenario general del microambiente tumoral con las células y estructuras especializadas que lo componen. Creado con Biorender.com.

3.1 Microambiente tumoral del CaP

Estudios recientes ponen de manifiesto que la oncogénesis prostática implica una comunicación cruzada entre las células epiteliales y el estroma circundante a través de una secuencia de cambios celulares intrínsecos y alteraciones del microambiente tumoral que controlan la gravedad de la enfermedad, la capacidad metastásica y la resistencia a las terapias convencionales (140).

Varios componentes de la matriz extracelular se han descrito en la diseminación y propagación del CaP. En un estudio *in vitro* con células PC3, se ha reportado que el colágeno tipo I puede facilitar la colonización y el crecimiento de células de CaP metastásicas en el microambiente óseo (141). En cuanto a los cambios en las interacciones célula-célula, se ha reportado por una parte la pérdida de adhesión mediada por E-cadherina y por otra la regulación al alza de N-cadherina y cadherina-11 (142). Y en el CaP avanzado, se ha visto un aumento de la producción de metaloproteinasas de la matriz extracelular

(MMPs)-2, -7, -9 y MT1-MMP dentro del microambiente tumoral y en circulación, lo que podrían ser utilizadas como herramientas de pronóstico (143).

Los fibroblastos asociados al cáncer conducen a la formación de un "estroma reactivo" descontrolado que estimula la proliferación y la agresividad de las células cancerosas y afecta la respuesta al tratamiento. En la transformación neoplásica prostática, las células del músculo liso se reemplazan por estos fibroblastos asociados al cáncer (144).

Las células endoteliales, tal y como se ha demostrado *in vitro* su participación en la autofagia al suprimir la expresión de AR, lo que conlleva la inestabilidad de proteínas de adherencia y en último término la promoción de la metástasis e invasión del CaP (145).

En cuanto a las células inmunitarias, estudios histológicos ponen de manifiesto que la infiltración de éstas (causada por reflujo urinario, dieta alta en grasas...etc) se asocia con CaP de alto grado (146). En este contexto, la inflamación persistente provoca una afluencia de varias células y un medio rico en citoquinas y quimioquinas como puede observarse en la Figura 7, que desempeñan un papel en el control de la angiogénesis y la proliferación celular (147).

Diferentes estudios han establecido relaciones entre el nicho inmune y el mal pronóstico y peor supervivencia en pacientes con CaP como por ejemplo el aumento en la densidad de volumen de los macrófagos y la expansión del tumor por la secreción de FGF-2 por los mastocitos (148,149). El TNF- α en función de los estímulos puede contribuir en la regresión de la próstata después de la TDA (150) o promover la proliferación celular y el crecimiento tumoral mediante la activación de NF κ B (Cadenas ligeras kappa de las células B activadas) entre otros (151); la IL-6 actúa sobre las células epiteliales prostáticas de forma paracrina para modular la progresión tumoral (152), la IL-8 provoca una mayor adherencia de las células cancerosas al endotelio, lo que mejora la angiogénesis tumoral y la diseminación metastásica desensibilizando las células CaP a los andrógenos y facilitando la progresión hacia mCPRC (153) y los receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR6 y CXCR7 se relacionan con la patogenia del CaP (154).

También el tejido adiposo periprostático (TAPP), que se desarrollará en el próximo apartado, es un tejido metabólicamente activo que rodea el tumor de próstata y podría contribuir activamente en la progresión y agresividad del CaP.

En definitiva, la remodelación del microambiente tumoral constituye un paso crucial en el impulso de la invasividad del CaP que incluso a veces se da durante las etapas preneoplásicas. Esto sumado a que los ensayos clínicos con inhibidores de la angiogénesis y otros procesos relacionados con el microambiente tumoral del CaP han fracasado (155), impulsan a seguir profundizando en la implicación del microambiente tumoral en la fisiopatología del desarrollo y agresividad tumoral.

En la Figura 7 se muestra un diagrama esquemático del microambiente tumoral en el CaP.

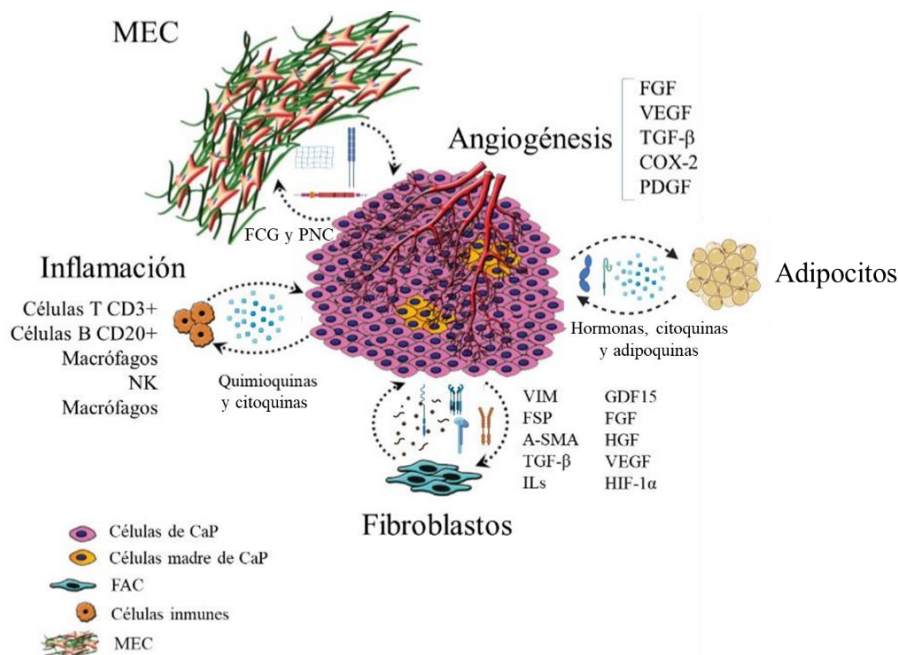


Figura 7. Interacciones en el microambiente tumoral en el contexto del CaP. Adaptada de Hisham, F. *et al.*, 2021 (156). Creado con Biorender.com. **Abreviaciones:** COX-2, Ciclooxygenasa-2; FAC, Fibroblastos asociados a cáncer; FCG, Fibras colágenas; HGF, Factor de crecimiento de hepatocitos; HIF-1 α , Factor 1-alfa inducible por hipoxia; ILS, Interleuquinas; PDGF, Factor de crecimiento derivado de plaquetas; PNC, Proteínas no colágenas; VEGFA, Factor de crecimiento endotelial vascular A; VIM, Vimentina; FSP, Proteína específica de fibroblasto; A-SMA, Actina del músculo liso alfa.

4. Tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) en mamíferos, es de tipo conectivo laxo y se origina a partir del mesénquima embrionario, almacena el exceso de energía en forma de grasa, y aísla y protege mecánicamente a órganos vitales (123).

El TA regula diferentes procesos metabólicos y fisiológicos como el balance hormonal, la inflamación, la hipoxia, la hematopoyesis, la linfopoyesis y es considerado un órgano endocrino ya que secreta factores lipídicos o proteicos denominados adipocinas con funciones endocrinas y paracrinas. Además, juega un papel importante en la iniciación y progresión de tumores puesto que se adapta dinámicamente a las necesidades metabólicas de las células cancerosas, pero los mecanismos subyacentes aún no se han estudiado en profundidad (157,158).

4.1 Tipos y composición del tejido adiposo

Histológicamente, se distinguen tres tipos principales de TA: el TA blanco, que representa más del 95% de la masa grasa; el TA marrón, que representa el 1-2% de la masa grasa; y el TA beige, que es difícil de cuantificar ya que se encuentra disperso debajo de la piel cerca de la columna y la clavícula en adultos y no se puede extraer en su totalidad. El TA blanco, implicado en la homeostasis metabólica, es el TA más dinámico del cuerpo humano y representa del 2 al 70% del peso corporal (159). El TA marrón, a diferencia del TA blanco está especializado en la termogénesis y contiene varias gotas pequeñas de lípidos y mitocondrias con una alta expresión de la proteína desacopladora UCP1. Además, está mucho más innervado y vascularizado que el TA blanco y en los recién nacidos supone el 5% de su

masa corporal. El TA beige es resultado de la adquisición de propiedades morfológicas de los adipocitos marrones por parte de los blancos (proceso denominado *browning*) por la acción de ciertos estímulos como el frío (<20°C) y el ejercicio físico que activan la secreción de una hormona denominada irisina (160).

Atendiendo a su localización en el organismo, el TA blanco se clasifica en visceral, subcutáneo e intramuscular. El TA visceral se diferencia del subcutáneo en que el primero secreta citoquinas y factores proinflamatorios, que tienden a inducir un ambiente desfavorable para los órganos y contiene adipocitos de mayor tamaño menos sensibles a la insulina y menos ávidos por la captación de AG. El TA subcutáneo, por otro lado, es más un productor de energía y calor (86).

En personas no obesas, la mayoría del TA es del tipo subcutáneo que se encuentra entre la piel y la cavidad peritoneal y representa aproximadamente el 80% de los depósitos de grasa, seguido por el TA visceral que se localiza dentro de la cavidad abdominal rodeando los órganos (5-20%) y el TA intramuscular que agrupa múltiples depósitos pequeños. Otros depósitos de grasa distribuidos en otras zonas del cuerpo son el periarticular, el mamario, el gastaepicárdico y el perivascular.

El TA blanco, también conocido como tejido adiposo unilocular, se encuentra principalmente debajo de la piel, rodeando órganos internos, alrededor de las articulaciones, en las mamas femeninas, entre el epicardio y el miocardio, alrededor de los vasos sanguíneos y dentro de la médula ósea; así como el TA marrón se encuentra sobre todo en la región supraclavicular, cervical, paravertebral y en las áreas tiroideas (Figura 8) (90,158).

En cuanto a la composición celular del TA, el 90% del volumen son adipocitos, y el resto son células que forman la fracción estromal-vascular que incluye preadipocitos, células endoteliales, fibroblastos, pericitos, células madre mesenquimales derivadas de TA (ADMSC), y células del sistema inmunitario innato y adaptativo (macrófagos, mastocitos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y células espumosas) (Figura 9). La proporción de los diferentes tipos celulares presentes en la fracción estromal-vascular puede variar según la situación fisiológica (como la inflamación) y la localización y se puede considerar como un tejido conectivo un tanto atípico puesto que posee muy poca matriz extracelular (MEC).

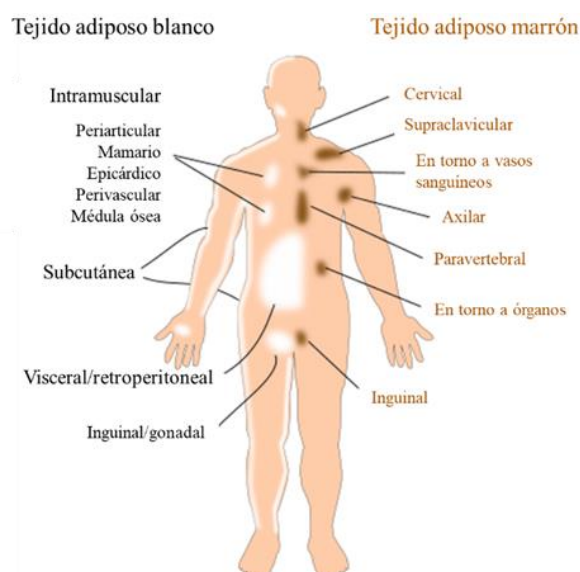


Figura 8. Distribución principal del tejido adiposo blanco y del tejido adiposo marrón en humanos adultos. Adaptada de Gesta, S. *et al.*, 2019 (161).

Los preadipocitos son morfológicamente similares a los fibroblastos que, tras la estimulación adecuada, derivan en adipocitos maduros. La capacidad de los preadipocitos para proliferar y diferenciarse, así como su susceptibilidad para sufrir apoptosis, difiere según la localización del tejido y el estado metabólico y patológico del paciente. En cuanto a la presencia de ADMSC en el TA blanco del adulto, pone en evidencia la capacidad para generar nuevos adipocitos, hecho que constituye otra diana de estudio en torno a la homeostasis energética y obesidad (162). Y el tipo celular inmunitario más abundante en TA blanco son los macrófagos, que aumentan proporcionalmente con la obesidad y su infiltración se acentúa alrededor de los adipocitos necróticos eliminando las gotas de lípidos residuales de dichos adipocitos (157,163,164).

En conclusión, la complejidad celular del TA pone aún más en evidencia un papel dinámico y activo en la regulación de la homeostasis energética.

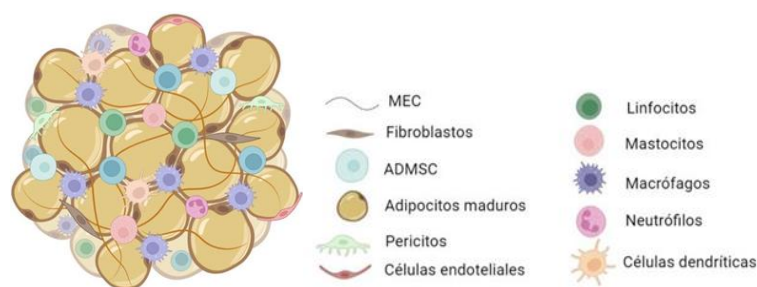


Figura 9. Heterogeneidad celular característica del tejido adiposo: adipocitos y fracción estroma-vascular. Creado con Biorender.com.

4.2 Obesidad y cáncer

La obesidad se produce por una acumulación excesiva de TA a causa del desequilibrio energético por el estilo de vida que puede ser agravada por rasgos genéticos y se ha relacionado con muchas enfermedades incluyendo las cardiovasculares, las hepáticas, la diabetes tipo 2, la hipertensión, la dislipemia y también el cáncer según evidencias de la última década (165). De hecho, se han estimado en este sentido varias asociaciones: a la obesidad se le atribuye al 4-8% de todos los cánceres (165); más del 40% de los pacientes con CaP, cáncer de mama, colon, hígado y páncreas son obesos (123); la supervivencia es baja en pacientes obesos con cáncer de mama, colorrectal o uterino; y la probabilidad de recurrencia es muy alta en aquellos con CaP, cáncer de mama, colorrectal y gastroesofágico (165). Uno de los problemas que presentan estos pacientes oncológicos obesos es que no responden bien a la quimioterapia estándar por lo que las guías *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) recomiendan evaluar y prescribir la quimioterapia en función del peso (166).

Los estudios centrados en esta asociación obesidad-tumor se basan en datos antropométricos y estilo de vida en humanos, así como el uso de modelos animales y/o líneas celulares. Respecto a la primera aproximación, un estudio en mujeres postmenopáusicas, reveló que tener un $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ es un factor de riesgo de padecer cáncer de mama y que en un 30% de las pacientes podría haberse evitado (167). En cuanto a los estudios experimentales, se listan a continuación algunos efectos de la obesidad que se han visto en distintos tipos de tumores (Figura 10):

- Colon: aumento de la proliferación, metástasis y quimiorresistencia del tumor debido a una mayor producción de IL-6, IL-4, IL-8, aumento de colonias de granulocitos y número de macrófagos (168), leptina (LEP), resistina y grelina según datos *in vitro* y en ratones (169)
- Mama: estudios de co-cultivo de líneas celulares tumorales y adipocitos se ha observado un aumento de la proliferación y migración de las células tumorales por una mayor captación, acumulación y oxidación de AG en el tumor (137)
- Endometrio y ovario: la obesidad se ha asociado a una mayor síntesis de estradiol a partir de andrógenos gracias a la aromatasa presente en el TA periférico (aunque los datos epidemiológicos son limitados e inconsistentes) (170)
- Hígado: estudios *in vitro* han revelado que el co-cultivo de hepatocitos y adipocitos, provoca una inhibición de la apoptosis de las células cancerosas que podría deberse a la sobreexpresión de una citoquina que induce la infiltración de neutrófilos (IL-17A) y un oncogen (*URII Prefoldin Like Chaperone*) (171)
- Páncreas: se ha observado que un aumento en la proliferación, inflamación y quimiorresistencia que podría ir asociado a la alteración de la microbiota intestinal y al aumento de la liberación de insulina, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), adipoquinas (lipocalina-2, LEP, resistina, apelina y visfatina), citoquinas (TNF- α , IL-6 e IL-1) y estrógenos tal y como se ha visto en modelos de rata, ratón y líneas celulares (172)

Hemos destinado el apartado 4.1.2 para centrarnos en el tejido adiposo que rodea la próstata, el TAPP, y su asociación con la obesidad y el CaP.

En definitiva, comprender la interacción entre los adipocitos y las células tumorales *in vivo* sigue siendo un vacío importante en este campo por lo que se requieren más estudios, siendo el cáncer de mama y de colon las neoplasias malignas con más datos en el campo en mujeres (especialmente tras la menopausia) y hombres, respectivamente según la agencia federal de los Estados Unidos *Centers for Disease Control and Prevention* (<https://www.cdc.gov>).

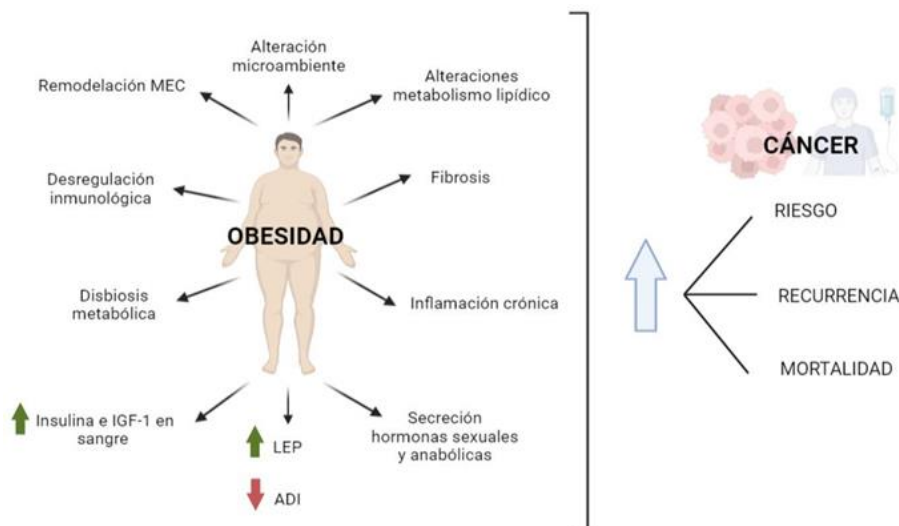


Figura 10. Relación entre la obesidad y el riesgo asociado con el desarrollo de cáncer, su recurrencia y mortalidad. Es probable que diferentes mecanismos conduzcan al desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Fuente: Sukanya, P. *et al.*, 2023 (165). Creado con Biorender.com. **Abreviaciones:** ADI, Adiponectina.

4.3 Tejido adiposo peritumoral

El TA circundante al tumor se denomina tejido adiposo peritumoral (TAP) y se ha involucrado en diferentes procesos potenciando la agresividad tumoral.

En general, factores secretados por el TAP (adipoquinas, quimioquinas, metaloproteinasas, factores inflamatorios, de crecimiento y angiogénicos entre otros) pueden promover el comportamiento maligno de diversas células cancerosas (173) (Figura 11).

Además, la expresión de otros factores se puede ver disminuida como es el caso de los factores de transcripción PPAR γ y CEBP α (CCAAT proteína de unión potenciadora alfa), hecho que se ha corroborado en el TAP de mama tanto *in vitro* como *in vivo* que

conlleva una potenciación de la invasividad de las células tumorales (174) así como también se ha reportado una disminución en la adiponectina ya que desempeña un papel protector evitando la angiogénesis, migración e inflamación según modelos *in vitro* en hígado entre otros (175).

También se ha observado en el TAP una activación de la lipólisis provocada por las células tumorales conduciendo a la movilización de AG de los CAA hacia el tumor que se almacenan y oxidan en las células tumorales promoviendo la proliferación y migración tumoral. Esta liberación de AG por los CAA parece ser propiciada por las lipasas ATGL y HSL según experimentos de co-cultivo entre líneas celulares tumorales de mama y de adipocitos (137).

4.3.1 Tumores estrechamente relacionados con el tejido adiposo peritumoral

En el cáncer de mama, el TAP participa desde la tumorigénesis hasta la metástasis e invasividad pasando por la progresión tumoral. Primeramente, los CAA contribuyen a la tumorigénesis al secretar mayores niveles de LEP, TNF- α y MCP-1 (Proteína quimioatrayente de monocitos de quimioquinas) (177) y al formar una estructura similar a una corona con adipocitos muertos rodeados de macrófagos (CLS: *crown like structure*), según puede verse microscópicamente, que actúan como mutágenos (178). En

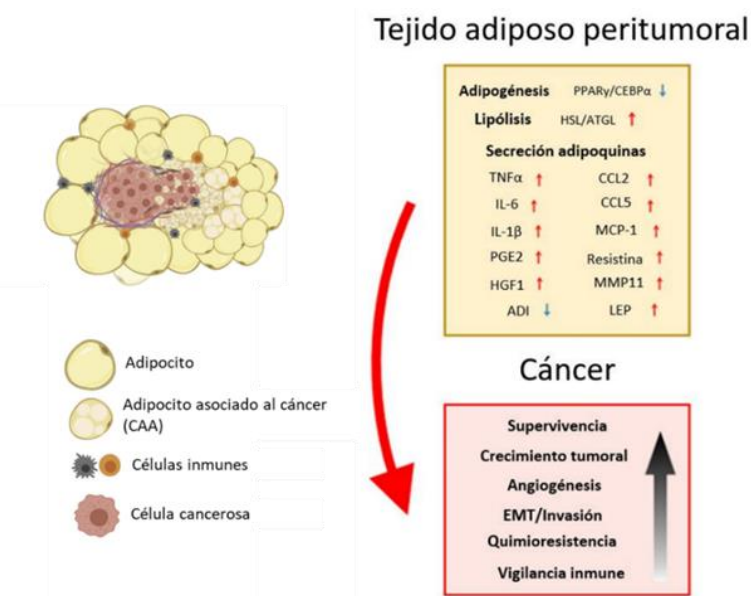


Figura 11. Papel oncogénico general del tejido adiposo peritumoral. Adaptada de Heeju, N. *et al.*, 2023 (176). Creado con Biorender.com. **Abreviaturas:** HGF1, Fibroblasto gingival humano -1; PGE2, Prostaglandina E2.

cuanto al evento de progresión tumoral, viene favorecido por la conversión morfológica de los adipocitos blancos maduros mediante el efecto *browning* (tal y como se ha visto al poner en contacto explantes de TAPP y una línea celular de adipocitos) (179) y por la secreción aumentada de LEP, autotaxina e IGF *in vitro* (180,181) y MMP11 *in vitro* (174). Y respecto a la invasividad y metástasis, los AG provenientes de la lipólisis de los CAA influyen en la integridad de la matriz extracelular (182) y la EMT (183). En concreto, en el cáncer de mama triple negativo, la abundancia de CCL5 en el TAP se asocia con metástasis y una peor supervivencia general (184). También se ha reportado que los preadipocitos y adipocitos maduros del TAP pueden ser estimulados por las células tumorales para ser convertidos a células similares a fibroblastos que también colaboran en la adquisición de este fenotipo invasivo de las células de mama *in vitro* e *in vivo* (183). Además, se sabe del papel en la resistencia a la radioterapia por parte de los CAA vía Chk1 (quinasa que regula el ciclo celular) e IL-6 según resultados *in vitro* (185).

En el cáncer de ovario, los adipocitos situados dentro del epiplón u omento (repliegue peritoneal formado por cuatro capas de TA) participan en el alojamiento inicial de las células tumorales, en su supervivencia (por la secreción de IL-8) (186), en las tres etapas principales de la metástasis en este tipo de cáncer (desprendimiento del tumor primario, migración por el líquido peritoneal e invasión mesotelial) (187,188) y en la quimiorresistencia (189).

En la leucemia, la disminución de la hematopoyesis se ha atribuido a una alteración de la función del TA de la médula (190). Los adipocitos además estimulan la proliferación y supervivencia de las células leucémicas mediante la alteración del metabolismo y la secreción de diversos factores de crecimiento (como VEGF e IGF-1), citoquinas y quimioquinas (como IL-6, IL-8 y CCL-2), moléculas de matriz (fibronectina y colágeno), hormonas (LEP y ADI) y metabolitos (como AG y lactato) (190). También se sabe que el TAP contribuye a la quimiorresistencia porque aquí pueden alojarse las células madre leucémicas (191) y porque aporta glutamina, que contrarresta la degradación de asparagina y glutamina inducida por el fármaco L-asparaginasa (192).

En el melanoma, los adipocitos promueven la proliferación de células tumorales mediante la secreción de adipoquinas (193) y podrían participar en la metástasis regulando positivamente los niveles de la quimioquina CCL21 en los ganglios linfáticos aumentando la expresión de su receptor (CCR7) en células de melanoma y provocando la expresión de genes asociados a la EMT en el tumor (194).

En cáncer de hígado, el microambiente inflamatorio crónico de bajo grado típico de este tumor es propiciado en parte por la liberación de LEP y AG por parte del TA visceral (195). En tumores hepáticos humanos, se asocia la expresión elevada de URI con un incremento en los niveles de IL-17A y de su receptor (IL-17RA) en el tejido peritumoral de pacientes obesos tanto a nivel de RNA como de proteína (196).

En el cáncer de páncreas, se ha establecido que la infiltración de la grasa peripancreática se asocia con un peor pronóstico (197) y que la activación de una respuesta inflamatoria en el TA intra o peripancreático provoca inflamación y fibrosis en el tejido pancreático promoviendo la progresión del tumor y quimiorresistencia. Además, la liberación de AG, glicerol, glutamina y metaloproteasas por parte de los adipocitos peritumorales ayudan en el crecimiento tumoral y la metástasis (198,199).

En el cáncer de colon, el TAP está expuesto a un proceso de EMT que conduce a la adquisición de un fenotipo de adipocito menos diferenciado que favorece la progresión tumoral en ratones (200). También se ha descrito una mayor secreción de marcadores inflamatorios en explantes de TAP a través de un mecanismo independiente de COX-2 y PPAR γ (168) que conduce a la activación de la peroxidación lipídica y en último término a la proliferación, diferenciación, supervivencia celular, migración, apoptosis y angiogénesis (201). Además, el aumento de la secreción de LEP y visfatina por parte del TAP ejercen propiedades proinflamatorias, mitogénicas, antiapoptóticas, angiogénicas y migratorias (125,202).

En las células de cáncer de estómago, a causa de la proximidad de los adipocitos al tumor, se han encontrado niveles aumentados de ácido palmítico y ácido oleico que contribuyen a la alta proliferación de las células tumorales (203,204).

En cuanto al mieloma múltiple, se ha demostrado que las adipoquinas y factores inflamatorios secretados por los adipocitos, están implicados en todas las fases de tumorigénesis, transformación, proliferación, invasión, angiogénesis, metástasis y quimiorresistencia (205–207). También se han descrito mayores concentraciones de IGF-1 asociadas con una peor supervivencia (208).

En la Tabla 10 se detallan los efectos de los adipocitos en los diferentes tipos de cáncer descritos previamente y los mecanismos moleculares asociados y las diferentes moléculas secretadas.

Tipo de cáncer	Secreción TA peritumoral	Mecanismo/s molecular/es	Efectos sobre el tumor
Mama	MARCO, VSIG4, versicano, CD44 y AdipoR1	Inflamación	Tumorigénesis
	Triacilglicéridos y AG (CLS)	Especies reactivas de nitrógeno	
	AG	Captación de AG, β -oxidación mitocondrial y EMT	Proliferación, migración, invasión y metástasis
	LEP	Migración de macrófagos	Crecimiento y quimiorresistencia
	IL-6, IL-8, MMP9, MMP11, PAI-1 y MCP-1	EMT, JAK/STAT3, Akt PLOD2 y respuesta al daño del ADN	Invasión, metástasis, radioresistencia y migración
	ATX	Hidrólisis de lisofosfatidilcona en lisofosfatidato	Invasión, migración y supervivencia
	TNF- α	Aumento de estrógeno	Agresividad
	IGF-1	PI3K/AKT y MAPK	Proliferación
	IGFB-P2	MMP2, E-cadherina	Migración e invasión
	Colágeno VI y endotelina	Reclutamiento de macrófagos	Tumorigénesis y desarrollo
GDF15	pAkt	Resistencia a trastuzumab	

Mama	Resistina	TLR4/NF- κ B/STAT 3, EMT	Crecimiento, migración e invasión	
	Adipsina	C3a/C3aR	Proliferación y crecimiento	
	Gadiponectina	Autofagia	Invasión	
	β -hidroxibutarato	Epigenética	Crecimiento tumoral	
Ovario	LEP	JAK2, Akt y ERK	Anti-apoptosis (proteína Mcl-1)	
		MMP-2 y MMP-7 (ERK y JNK)	Invasión mesotelial	
	Ácido araquidónico	Akt y apoptosis inducida por cisplatino	Quimiorresistencia	
	Colágeno VI	Se desconoce	Remodelación de la MEC	
	HGF, IGF-1, FGF, IL-6, IL-8, IL-11 e IL-33	Reducción o inhibición de E-cadherina, β -catenina y caveolina-1	Metástasis (Desprendimiento del tumor primario)	
	IL-8, TIMP-1, IL-33, MCP-1, HGF, LEP e IL-6	ERK, PI3K/AKT/mTOR, EK1/2 y JNK1/2 y STAT3	Metástasis (Migración por el líquido peritoneal)	
	IL-6	VEGF (STAT3)	Ascitis (metástasis distantes)	
	TNF α	CD44 (activación JNK y HGF)	Invasión mesotelial	
	SIK2	Acetil Co-A carboxilasa, CPT1 y PI3K/Akt SREBP1c/FASN y SREBP2/HMGCR	Síntesis y oxidación de AG	
	Apelina	AMPK-CPT1		
	IL-17A	STAT3/FABP4	Captación de lípidos	
	AG	Expresión FABP4 y ROS CD36	Metástasis y quimiorresistencia Invasión, migración, adhesión, clonogenicidad y metástasis	
	Leucemia	AG	Metabolismo	Supervivencia, quimiorresistencia y crecimiento
		ADI	AMPK y metabolismo	Supervivencia
LEP y CXCL12		Se desconoce	Proliferación, migración y quimiorresistencia	
PIM-2		Protección citotoxicidad		
Glutamina		Fuente local	Quimiorresistencia	
Aldo-ceto reductasas y carbonil reductasas		Absorción y metabolización de fármacos		
IL-6, CCL-2, IL-8, CXCL12, CCL-20, IGF-1, VEGF, TGF- β , lactato, AG, ATP extracelular, fibronectina y colágeno		Crecimiento, angiogénesis, inflamación y quimiotaxis	Proliferación y supervivencia	
Melanoma	LEP, resistina, visfatina, osteopontina y PAI-1	AKT, mTor y ERK	Proliferación y quimiorresistencia	
	Ácido palmítico	Akt	Proliferación y crecimiento tumoral	
	AG	FATP	Proliferación, invasión, metástasis y crecimiento tumoral	
	MMP-9, MMP-2, COX-2, ciclina D1, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, survivina e IAP-2	AKT/mTOR	Invasión y metástasis	
	IL-6, MMP9 y vimentina	KISS1 y E-cadherina		
	HGF, VEGF y endocan	Angiogénesis		
	FASN, Cav-1, glicoproteína P y PD-1	Linfocitos T	Quimiorresistencia	

Hígado	AG, glicerol y factores inflamatorios	Inflamación, resistencia a la insulina, peroxidación lipídica y estrés patógeno del retículo endoplásmico	Tumorigénesis (microambiente inflamatorio crónico de bajo grado)	
	Ácido linoleico	Interrupción de la función mitocondrial y pérdida selectiva de células T CD4+ intrahepáticas		
	IL-6, TNF- α , LEP, MCP-1 e HIF-1	STAT3, PI3K/AKT/mTOR, ERK y JNK	Proliferación	
	LEP	STAT3, hTERT, ciclina D1 y BAX		
	ADI	NF- κ B, insulina y Akt/STAT3		
Páncreas	AG	Se desconoce	Migración, invasión, EMT y resistencia a gemcitabina	
	Glutamina			
	TNF- α , IL-1 β , IL-6, LEP, resistina, lipocalina-2, apelina, visfatina e IGF-1 (obesos)	NF- κ B, MAPK/ERK y JNK	Proliferación	
	MMP-11 y colágeno I	Remodelación de la MEC	Invasión y metástasis	
	TNF- α	PI3K/AKT/mTOR y NF- κ B	Proliferación, angiogénesis y metástasis	
	IL-6	JAK/STAT3	Proliferación	
	LEP	JAK/STAT, PI3K y MAPK	Inflamación, antiapoptosis y angiogénesis	
	Colon	Visfatina	ERK/MAPK, PI3K/AKT, NF- κ β y β 1-integrina	Inflamación y angiogénesis
			Unión CXCR4 y CXCR7 a factor 1 derivado de células estromales	Supervivencia y migración
		Ácido oleico	Metabolismo, autofagia y EMT	
Estómago	4-HNE	MAPK, PI3K-AKT-mTOR y NF- κ B	Proliferación, diferenciación, supervivencia, migración, apoptosis y angiogénesis	
	Ácido oleico y ácido palmítico	Akt	Invasividad	
Mieloma	LEP e IL-6	JAK/STAT	Proliferación y unión a elementos de la MEC	
	LEP y adiposina	Activación de la autofagia y reducción de la apoptosis	Quimiorresistencia	
	Resistina	NF κ B y PI3K/Akt		
	TNF- α	IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α activan vía JNK	Progresión	
	Malondialdehído y 4-hidroxinonal	Reducción PTEN y vía PI3K/AKT	Tumorigénesis, transformación, proliferación, supervivencia, invasión, angiogénesis, metástasis y quimiorresistencia	
			Expansión	

Tabla 10. Mecanismos moleculares involucrados y efectos del TAP sobre algunos tipos de cáncer. Adaptado de Dumas *et al.*, 2021 (209). **Abreviaciones:** **AKT**, Proteína quinasa B; **AMPK**, Subunidad catalítica alfa 1 activada por AMP de proteína quinasa; **ATX**, Ectonucleótido Pirofosfatasa/Fosfodiesterasa 2; **BAX**, BCL2 asociado a X regulador de apoptosis; **CD44**, Cluster de diferenciación 44; **ERK**, Proteína quinasa 1 activada por mitógenos; **FATP**, Familia de transportadores de solutos 27 Miembro 1; **FGF**, Factor de crecimiento de fibroblastos; **GDF15**, Factor de diferenciación de crecimiento 15; **HMGCR**,

3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; **hTERT**, telomerasa transcriptasa inversa; **IGFBP2**, Proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; **JAK**, Janus quinasa; **JNK**, Proteína quinasa 8 activada por mitógenos; **KISS1**, Supresor de metástasis KiSS-1; **MAPK**, Proteína quinasa activada por mitógenos; **MARCO**, Receptor de macrófagos con estructura colágena; **mTOR**, *Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*; **PAI-1**, Miembro 1 de la familia E de Serpin; **PD-1**, Muerte celular programada 1; **PIM-2**, Protooncogén Pim-2, serina/treonina quinasa; **PI3K**, Fosfatidilinositol-4,5 bisfosfato 3-quinasa; **PLOD2**, Procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2; **SIK2**, *Salt Inducible Kinase 2*; **STAT3**, Transductor de señal y activador de la transcripción 3; **TIMP**, Inhibidor de metalopeptidasa; **TLR4**, *Toll Like Receptor 4*; **uPa**, Activador del plasminógeno tipo uroquinasa; **VSIG4**, *V-Set And Immunoglobulin Domain Containing 4*.

5. Tejido adiposo periprostático y CaP

El tejido adiposo periprostático (TAPP) es un depósito de grasa específico que rodea a modo de capa la superficie de la próstata (Figura 12). Se estima que está en contacto con aproximadamente la mitad de

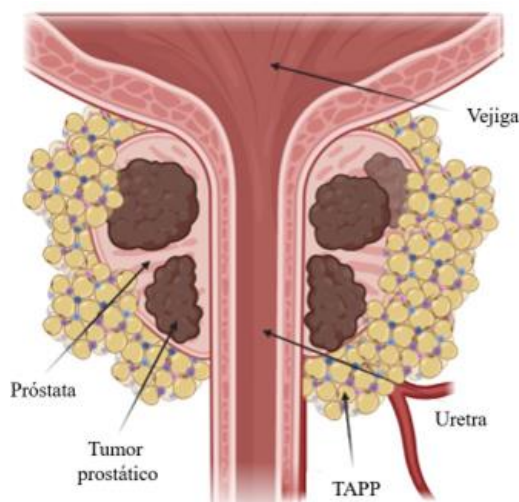


Figura 12. Ubicación del CaP y el tejido adiposo periprostático. Creado con Biorender.com.

la superficie de la próstata y está separada de ella por una capa fibromuscular de espesor variable denominada cápsula prostática (210). El TAPP varía en grosor y estructura en diferentes lugares de la próstata y a menudo se considera que es TA visceral a pesar de que se localiza en la región pélvica.

El TAPP, a diferencia del TA abdominopélvico, tiene menos vasos sanguíneos siendo un tejido hipóxico y presentando inflamación crónica y más MEC (sobre todo colágeno). También contiene más lóbulos, aunque de menor tamaño, separados por tabiques fibrosos que albergan grupos de adipocitos más pequeños (211).

Los estudios sobre el grosor del TAPP, la expresión de factores inflamatorios y la participación de la obesidad en la progresión del CaP, han demostrado que los cambios en el TA local pueden influir en el comportamiento del CaP. Aparte, las células del propio CaP inducen la pro-tumorigénesis en el TAPP (210).

5.1 Asociación entre el tejido adiposo periprostático y la agresividad del CaP

El TAPP podría estar implicado en la progresión del CaP dada su composición estructural y la liberación de proteínas, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, quimioquinas y AG que son liberados al entorno extracelular.

Por una parte, se ha visto que el TAPP podría favorecer la agresividad del CaP dado el estado hipóxico crónico en el que se encuentra a causa de su gran abundancia de matriz extracelular, sobre todo colágeno (211).

Se detallan a continuación los compuestos secretados por el TAPP que se han descrito en la literatura involucrados en la agresividad del CaP:

- LEP: estimula las células endoteliales, estromales e inmunitarias según numerosos estudios *in vivo* (humanos y ratones) e *in vitro* (164)
- IL-6: regula la proliferación y la invasividad activando IGF-IR en modelos celulares *in vitro* y en ratones mediante la fosforilación de STAT3 (estudiado a nivel génico y proteico) (212). Respecto a lo anterior, Finley *et al.* (los primeros en estudiar los niveles de adipoquinas en la grasa periprostática), encontraron que hay hasta 375 veces más IL-6 en el TAPP que en el suero de pacientes con CaP y que STAT3 se encuentra en niveles más altos en el TAPP de pacientes con CaP de alto grado (213)
- IGF-1: aumenta la viabilidad y la resistencia a docetaxel según experimentos de co-cultivo de TAPP con células DU145 y PC3 (214)
- CCL7 (*C-C Motif Chemokine Ligand 7*): promueve la extensión extraprostática del tumor (extensión a áreas cercanas fuera de la glándula prostática), el denominado CaP extraprostático, a través de la unión al receptor CCR3 expresado por las células tumorales (215). En concreto, se sabe que esta comunicación se debe principalmente a los preadipocitos del TAPP que según se ha visto son más abundantes en CaP vs HBP y en el TAPP vs otros tipos de TA visceral (216)
- MMP-2: proliferación y migración tal y como se ha visto *in vitro* en las células LNCaP y PC3 (213)
- Andrógenos: se ha reportado la presencia de andrógenos activos en el TAPP y enzimas implicadas en su síntesis (CYP17, CYP19 y 5- α -reductasa) según datos aportados por cromatografía y espectrometría de masas, que se piensa que podrían favorecer el crecimiento y la metástasis del CaP y estar relacionados con el CaP resistente a la castración al estimular las células cancerosas portadoras de AR, que se vuelven hipersensibles a su ligando (217)
- AG: se ha reportado que el medio de las células C4-2B, PC-3 y DU-145, es capaz de inducir la liberación de AG en adipocitos aislados del TAPP, que posteriormente son transferidos y acumulados por estas células tumorales, aumentando el estrés oxidativo por inducción de NOX5 (NADPH Oxidasa 5) y contribuyendo a la estabilización de HIF-1 que, a su vez, aumenta la expresión de MMP14, lo que confiere una ventaja invasiva a las células tumorales (218)

En cuanto a estudios comparativos de secretoma realizados con TAPP, cabe destacar un estudio reciente con TAPP de pacientes con HBP, CaP no agresivo o CaP agresivo que reportó profundas diferencias en productos secretados por este tejido según la agresividad del CaP, aunque con un número reducido de muestras y con diversos orígenes de las proteínas aparte del TAPP, como los vasos sanguíneos y las células inflamatorias. Los autores detectaron que la concentración y diversidad de proteínas liberadas por el TAPP de pacientes con CaP, en concreto en estadio T3, era significativamente mayor, en relación con los T2 y los de HBP (219). Otro estudio que también aborda el contenido proteico del secretoma del TAPP de pacientes de CaP comparando los de bajo grado vs de alto grado, mostró un perfil

metabólico enriquecido en las muestras de TAPP de CaP de alto grado en rutas relacionadas con la producción de energía (indicando un mayor requerimiento de energía por parte del tumor), la respuesta hormonal, la síntesis de poliaminas y el control de síntesis de proteínas mediante el metabolismo de aminoácidos, ARN y nucleótidos (158).

5.1.1 Grosor/cantidad del tejido adiposo periprostático

Hay evidencia suficiente que apunta a que el grosor del TAPP está relacionado con la progresión del CaP. A continuación, se describen por orden cronológico los estudios que avalan este hecho.

Van Roermund *et al.*, reportaron por primera vez que el área y la densidad de TAPP medida por tomografía computarizada (TC) se asocia con una puntuación de Gleason ≥ 8 en la biopsia (220).

Un año más tarde, en 2012, se confirmó que el grosor del TAPP, medido por ultrasonografía transrectal (TRUS), es un factor de riesgo para el CaP y puede utilizarse como predictor para el CaP de alto grado en la biopsia (221).

En 2015 mediante el uso de resonancia magnética (RM), se ratificó que el grosor del TAPP está correlacionado significativamente con una mayor puntuación de Gleason y es un factor predictivo independiente para el CaP de alto grado (222), respaldado posteriormente por Dahran *et al.*, quienes analizaron 162 pacientes con CaP localizado que se sometieron a PR (prostatectomía radical) e informaron que los pacientes con una puntuación de Gleason posoperatoria ≥ 7 tenían un volumen de TAPP más alto (medido con RM) (223).

También se ha reportado que el volumen de TAPP podría identificar a pacientes en riesgo de recaída bioquímica antes de comenzar la TDA (224) y que su medición por RM es un predictor significativo y fácilmente disponible en el tiempo hasta el mCPRC, antes de la biopsia guiada por TRUS o la TDA (225). En cambio, la relación entre la recurrencia del CaP tras realizarse una PR y la distribución del TAPP, no es significativa según hallazgos recientes (226). En cuanto a los pacientes que reciben radioterapia, se ha observado que la abundancia de TAPP medido por TC se asocia con un mayor riesgo de recurrencia (227) y en el caso de hombres sin tratamiento previo con CaP avanzado, se puede predecir qué pacientes tienen más probabilidades de desarrollar mCPRC mediante el espesor de TAPP por RM (228).

En pacientes sometidos a PR, el grosor del TAPP obtenido por mpMRI (resonancia magnética multiparamétrica) junto con el volumen de la próstata y la puntuación Gleason, se podrían usar como factores predictivos de la sobre-estadificación de T1/2 clínico a T3 patológico (229).

Recientemente, en el 2021, mediante mpMRI, en hombres con CaP localizado en VA (vigilancia activa), se detectó que un mayor espesor de TAPP se asocia significativamente con una puntuación de Gleason más alta (230).

Y el último estudio reportado hasta la fecha (2023), asocia una mayor cantidad de TAPP (medida por RMN) sumada al Gleason, con el estadio T patológico en pacientes con CaP sometidos a PR laparoscópica (231).

5.1.2 Tejido adiposo periprostático y obesidad

La conexión entre la obesidad y el riesgo de desarrollar CaP no es del todo concluyente (232,233). De los datos que se han publicado hasta la fecha, se destaca que hay una clara asociación positiva entre el IMC y el riesgo de CaP de alto grado no metastásico (234) y el riesgo de mortalidad (235,236), cifrando que este último es 1,07 por cada 5 kg/m² de IMC (237). No obstante, queda por determinar si la pérdida y el mantenimiento del peso, junto con un mejor tratamiento clínico, puede mejorar el pronóstico del CaP (238) ya que contradictoriamente, otros estudios con cohortes mayores indican que la obesidad está asociada inversamente con el riesgo de CaP en hombres de mediana edad (233). En este sentido, un estudio *in vivo* que utilizó un modelo de ratón con CaP y obesidad, reportó una deficiencia de p62 (proteína que permite la autofagia selectiva) en el TA que provocaba un aumento en la secreción de osteopontina y un aumento de macrófagos en el TA blanco, que asociaron a la migración e invasión del tumor de CaP (239).

Varias modificaciones tienen lugar en el TAPP de pacientes obesos que podrían amplificar la comunicación nociva establecida entre este depósito de grasa y el CaP.

A raíz de un estudio realizado con paneles de genes (240), se observó que el TAPP de pacientes obesos puede contribuir a aumentar la adiposidad local, proporcionando un ambiente inmunoinflamatorio de bajo grado y facilitando la producción de moléculas con potencial oncogénico. Los diferentes perfiles de sobreexpresión fueron los que se listan a continuación:

- Anti-lipolítico: *NPY1R* y *NPY5R* (Neuropéptido Y Receptor Y1 e Y5 respectivamente)
- Adipo/lipogénico: *LEP*, *PNPLA*, *FADS1* (Ácido graso desaturasa 1) y *SREBP-1*
- Antiapoptótico: *ANGPT1* (Angiopoyetina 1) y *HSPB8* (Proteína de choque térmico Familia B pequeña Miembro 8)
- Crecimiento y diferenciación celular: *LEP*, *ANGPT1*, *NPY1R*
- Inflamatorio: *LEP*, que regula al alza la respuesta inmunoinflamatoria tanto innata como adaptativa; *NPY1R*, que se ha demostrado que inhibe la activación de las células T; *CYSLR2* (Receptor 2 de cisteinil leucotrienos), que aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias; y *FADS1*, conocido por mediar en la formación de mediadores inflamatorios como *PGE2*

Además, se ha descrito que el TAPP de pacientes obesos tiene una mayor actividad de MMP-9 y MMP-2 (medida por zimografía), lo que podría provocar un aumento en la proliferación de células endoteliales *in vitro* (241), y una expresión más elevada de quimioquinas (*CXCL1*, *CXCL8*, *CXCL12* y *CXCR7*) (164,242), lo que podría favorecer la metástasis (243).

En un estudio reciente, también se ha reportado que la inflamación observada en el TAPP en pacientes con obesidad (medida por inmunohistoquímica por la formación de CLS) se ha relacionado con CaP de alto grado por un mayor tamaño de los adipocitos y mayores niveles circulantes de insulina y triglicéridos (244).

Un metaanálisis de 86.490 pacientes con CaP, reveló que el TAPP del paciente obeso, va asociado a cambios en el metabolismo de andrógenos y estrógenos, la insulina y factores de crecimiento similares a la insulina (213) que podría explicar la asociación entre la obesidad y la recurrencia bioquímica después de la PR (245).

Es importante añadir que, a diferencia de todos los demás depósitos adiposos, se sabe que el IMC no está relacionado con el volumen del TAPP. De hecho, en situación de obesidad, la fibrosis e inflamación junto a la naturaleza hipóxica del TAPP, explica su fracaso para expandirse. Aparte, el IMC, aunque sea el parámetro típico que define la obesidad, no es indicador robusto de adiposidad ya que no proporciona información sobre la composición corporal y no todos los hombres con IMC alto tienen más TAPP, y viceversa. De hecho, el TAPP se correlaciona con el volumen prostático, que está influenciado por la edad (211,246). Así pues, es necesario identificar/buscar mediciones de la salud metabólica del paciente cuando se considera el papel de la obesidad en el CaP.

5.2 Transcriptómica del tejido adiposo periprostático

El TAPP tiene un perfil transcriptómico característico. Un estudio de expresión génica en el que se utilizaron paneles de genes se comparó la expresión génica del TAPP de tres grupos de pacientes (n=6 de cada uno): CaP extraprostático, CaP confinado al órgano e HBP (240).

El resultado reveló que el TAPP de pacientes con CaP tenía expresión alterada en genes relacionados con:

- Diferenciación de adipocitos: *PLCB1* y *FFAR2* (Receptor de ácidos grasos libres 2). Esto se respaldó con la alteración de la vía ERK5 encontrada (involucrada en la señalización hipertrófica que regula la diferenciación adipogénica)
- Inmunovigilancia reducida: *CFH* (Complemento Factor H) y *CFHR1* (Complemento Factor H Relacionado 1) responsables de la inhibición del complemento; *MS4A1* (Membrana que abarca 4 dominios A1) que participa en la activación de células B; y *FFAR2* que está relacionado con monocitos, neutrófilos y la secreción de IL-8

Cuando compararon los resultados de expresión del TAPP de CaP extraprostático vs HBP detectaron cambios en genes relacionados con:

- Crecimiento y proliferación: *PLCB1* (Fosfolipasa C Beta 1), que modula la ciclina D3; *CDK4* (Quinasa dependiente de ciclina 4), que regula las transiciones G2-M y G1-S; *HAUS1* (*HAUS Augmin Like Complex Subunit 1*), que genera microtúbulos del huso en la mitosis; *TSPAN8* (Tetraspanina 8), que codifica una glicoproteína de unión a integrina que estimula la

proliferación de células endoteliales; *FGF16* (Factor de crecimiento de fibroblastos 16); y la regulación a la baja de *XAF1* (Factor 1 asociado a XIAP), que detiene el ciclo en G2/M

- Apoptosis: expresión a la baja de *XAF1* y *GADD45B* (Beta inducible de detención del crecimiento y daño del ADN); y al alza de *DRAMI* (Modulador de autofagia regulado por daños en el ADN 1)

Otro estudio posterior (211) también con TAPP en humanos comparó el TAPP con TA abdominopélvico de pacientes con CaP localizado, y observaron que la mayoría de los genes diferencialmente expresados estaban relacionados con hipoxia y la respuesta adaptativa que se produce tras esta en el metabolismo y la inflamación:

- Hipoxia: mayor expresión de *HIF-2 α* (Proteína 1 del dominio PAS endotelial), *VEGF-A* y *VEGF-B*
- Metabolismo: mayor expresión de *GLUT-2* (Familia de portadores de solutos 2 Miembro 2)
- Fibrosis: aumento de la expresión de genes que codifican marcadores de miofibroblastos productores de MEC (*SNAIL*, Represor transcripcional de la familia *Snail*; *INHBA*, Inhibina Subunidad Beta A; y *GREM1*, Gremlin 1 antagonista de BMP de la familia DAN) y genes involucrados en codificar diversas isoformas del colágeno (como el colágeno tipo IV y VI; y *COL1A2*, Cadena de colágeno tipo I alfa 2)
- Inflamación (mayor expresión de *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* y *PAI-1*; y menor expresión de *ADI*)

5.3 Lipidómica del tejido adiposo periprostático

La asociación entre los AG circulantes y el riesgo de CaP se ha examinado en varios estudios, pero hasta la fecha ninguna relación se ha considerado sólida ni clara. En este sentido, una revisión que reúne varias cohortes con un total 5000 pacientes con CaP y 6000 controles, ha reportado asociaciones entre el riesgo de CaP (aproximadamente un 15%) y niveles altos de ácido eicosapentaenoico y ácido docosapentaenoico y niveles bajos de ácido esteárico en sangre. Sin embargo, hay cierta contrariedad, ya que respecto a los dos primeros AG comentados, según el PHS (*Physicians' Health Study*) la asociación con el CaP es negativa y respecto al ácido docosapentaenoico, presenta heterogeneidad al estratificar los pacientes, siendo no significativo en los pacientes con alto riesgo (247).

Sin embargo, posteriormente, los estudios se han centrado más en la composición de AG del TAPP que los circulantes en sangre, cuando se trata de establecer una asociación con el riesgo de CaP, aunque los estudios detallados y cuantitativos del lipidoma del TAPP aún son limitados (detallados a continuación). Un estudio del 2015 realizado con pacientes con CaP o HBP, reveló la presencia de triacilglicérols como componente principal del TAPP y un perfil de AG dominado por MUFA, seguido de AG saturados (SFA) y PUFA. En el TAPP de pacientes con CaP en concreto, se detectaron altos niveles de ácido palmítico y ácido dihomo- γ -linolénico y bajos niveles de ácido araquidónico, aunque no estudiaron correlación entre el grado Gleason y los niveles de lípidos (probablemente por tratarse de

una cohorte que solo utiliza n=12 CaP y n=11 HBP) (248). Correlación que sí se encontró en otro estudio del año anterior (2014) que utilizó resonancia magnética espectroscópica *ex vivo* e informó que el TAPP de un total de 4 pacientes con CaP de tipo extraprostático, contiene una mayor proporción de MUFA/SFA (249).

En 2018, en un abordaje etnogeográfico con cohortes de pacientes afrocaribeños y caucásicos con CaP, se vio que, en los primeros, el TAPP contenía menos MUFA y n-3 PUFA (ácido eicosapentaenoico y ácido docosapentaenoico), y dos veces más n-6 PUFA, principalmente ácido linoleico. Factores como la dieta y la variación genética en el metabolismo de los AG podrían ser las causas en estas diferencias observadas. En cuanto a la agresividad del CaP, en la población de afrocaribeños, se observó una asociación entre el aumento de los niveles de SFA y MUFA y una disminución de ácido linoleico mientras que, en los caucásicos, la asociación con la agresividad del CaP se estableció con niveles bajos de ácido eicosapentaenoico (250). Hay que destacar que este estudio solo tiene en cuenta en su cohorte CaP indolente y de alto riesgo, siendo no representativa de todos los pacientes enfermos tratados mediante PR, lo cual, se necesitarían más experimentos para validar estos hallazgos.

Respecto a la influencia de la dieta en la composición de AG del TAPP, en 2016 ya se reportó una relación entre la progresión del CaP y la ingesta de grasas saturadas en americanos europeos respecto a afroamericanos y entre la agresividad del CaP y el colesterol en los primeros (modificable con suplementos o restricciones) (251).

Un estudio posterior, del 2020, analizó en este caso el perfil basal de AG secretados a partir de explantes de TAPP y TA subcutáneo, y detectó una menor liberación por parte del TAPP de especies PUFA (18:3 n-6, 20:3 n-6, 22:5 n-3 y 22:6 n-3) y una mayor liberación de SFA (16:0 y 20:0). Sin embargo, ninguna diferencia significativa fue detectada en relación con la agresividad del tumor (estratificación por Gleason *score*) (252). En consonancia, estos hallazgos también se han obtenido en muestras prostáticas: menor abundancia de las especies PUFA 20:3 n-6, 22:5 n-3, 22:6 n-3 y niveles elevados de SFA en pacientes con CaP (n=36) en comparación con los que padecían HBP (n=35) (253).

En resumen, a pesar de que se han realizado varios estudios de la composición lipídica del TAPP, estos son variables en cuanto a la tecnología utilizada, el tipo de población o grupo y el tamaño muestral. Dado su gran interés, una caracterización más completa del lipidoma del TAPP mediante técnicas más avanzadas como la cromatografía líquida y de gases en conjunto con la espectrometría de masas, podría brindar una mejor comprensión del CaP y además permitiría proporcionar nuevos factores de estratificación y por ende permitir el desarrollo de posibles vías para la intervención de la progresión del CaP.

6. Vesículas extracelulares (VEs) y cáncer

Las partículas extracelulares han sido consideradas durante mucho tiempo "desechos" celulares hasta 1967, cuando se observó que las plaquetas secretaban partículas ricas en lípidos con actividad

procoagulante (254). La designación de “vesículas extracelulares” (VEs) surgió en 2011 (255) y el ISEV (*International Society for Extracellular Vesicles*) las define como partículas liberadas por la célula, delimitadas por una bicapa lipídica que no pueden replicarse (256).

Estas VEs participan en la comunicación intercelular y se distribuyen en el líquido extracelular y en fluidos biológicos (256,257). En situaciones patológicas como el cáncer, las VEs han recibido gran interés por su participación en cada paso del desarrollo de esta enfermedad (258).

6.1 Clasificación, métodos de aislamiento y caracterización de las VEs

La heterogeneidad de las VEs también viene dada por la variedad de tipos y estados funcionales de las células liberadoras (concentraciones de factores de crecimiento (259), niveles de oxígeno (260), inflamación (261), etapa del ciclo celular, estrés y fase del ritmo circadiano (256)). Dependiendo del tamaño, las VEs pueden clasificarse en pequeñas (30-1.000 nm: exosomas y ectosomas) y grandes (500-10.000 nm: ectosomas, migrasomas, cuerpos apoptóticos y oncosomas grandes). Recientemente, se ha identificado un nuevo tipo: microvesículas mediadas por la proteína 1 que contienen el dominio de arrestina (ARMMs) (256) (Figura 13).

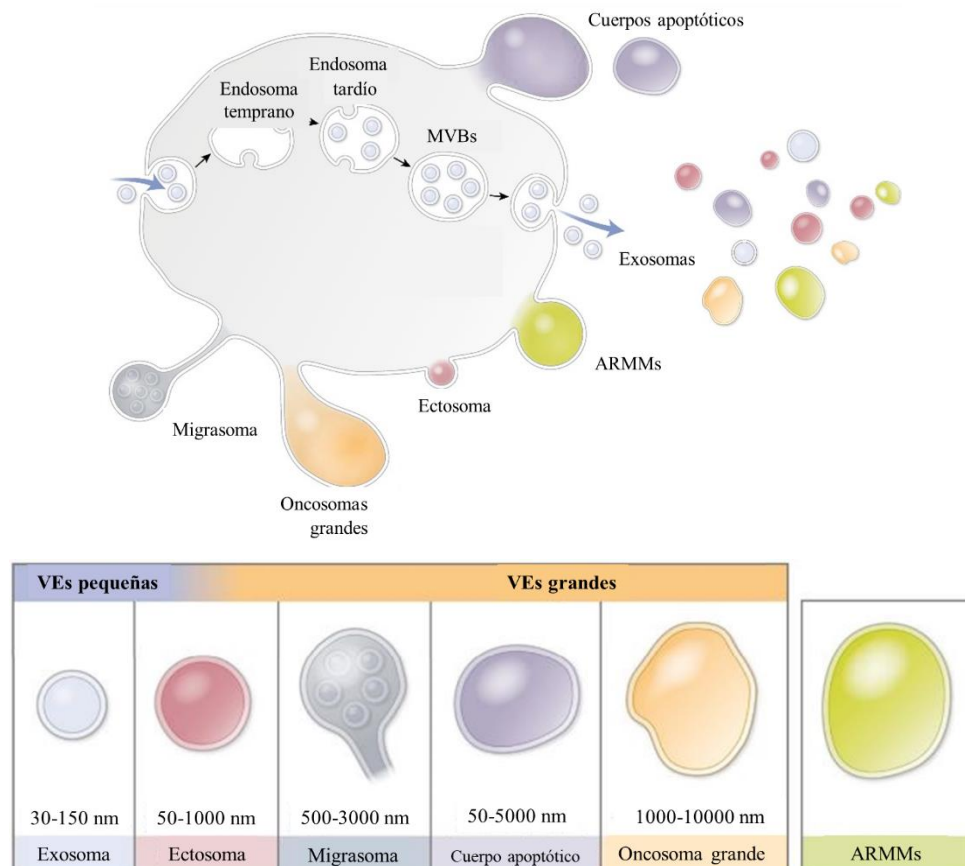


Figura 13. Heterogeneidad de las VEs. Adaptado de Salomon, C. *et al.*, 2022 (256).

Otra forma de clasificación de las VEs es la que atiende a su biogénesis (255) (Tabla 11).

Subtipos de VEs	Biogénesis	Marcadores de identificación
Exosomas	Fusión de los MVBs con la membrana plasmática y liberación del contenido al exterior	Integrinas, anexinas, flotilinas ALIX, TSG101, HSP70, CD62, CD63, CD9, CD81 y CD82
Ectosomas (o microvesículas, micropartículas)	Gemación directa desde la membrana plasmática. La formación de microvesículas implica la entrada de calcio y la contracción de actina cortical	Fosfatidilserina, proteínas anexina A1, algunas integrinas y selectinas, CD40 y factor de ribosilación ADP 6
Migrasomas	Liberación por células migratorias dependientes de la polimerización de actina	Proteína TSPAN4
Cuerpos apoptóticos	Extrusión de la membrana celular como parte del proceso apoptótico	Fosfatidilserina, anexina V, trombospondina y C3b
Oncosomas grandes	Liberación por células cancerosas ameboides	Proteína citoqueratina 18
ARMMs	Gemación externa de la membrana plasmática impulsada por ARRDC1	Proteína ARRDC1

Tabla 11. Clasificación de las VEs. Adaptado de Salomon, C. *et al.*, 2022 (256) y Kalluri, R. *et al.*, 2020 (262). **Abreviaciones:** **ADP**, Adenosina difosfato; **ALIX**, Proteína de interacción 6 de muerte celular programada; **ARRDC1**, Proteína 1 que contienen el dominio de arrestina; **CD**, Cluster de diferenciación; **C3b**, Oponina principal del complemento; **HSP70**, Proteína de choque térmico; **MVBs**, Cuerpos multivesiculares; **TSG101**, Gen de susceptibilidad tumoral 101; **TSPAN4**, Tetraspanina 4.

En cuanto a las VEs secretadas por la próstata, la población más estudiada son los “exosomas de próstata” y los primeros descritos fueron los “prostasomas” (a finales de los años 70 en plasma seminal) cuyo tamaño es mayor que los exosomas (50-500 nm) y su producción parece correlacionarse inversamente con el Gleason *score*. Si se da la situación de sobreexpresión de oncoproteínas, la próstata también puede liberar VEs del tipo “oncosomas grandes de próstata” (263,264).

Respecto al aislamiento de las VEs, los métodos se basan en técnicas de tamaño molecular (ultrafiltración, filtración tangencial y cromatografía de exclusión molecular), ultracentrifugación, precipitación y/o agentes agregantes, afinidad (citometría de flujo o inmunoafinidad) y microfluídica en exosomas (chips que aprovechan las propiedades físicas y bioquímicas en combinación con mecanismos acústicos, electroforéticos y electromagnéticos). La mejor aproximación es filtrar primero por exclusión molecular y después por afinidad (265).

La cuantificación de VEs se puede realizar de manera indirecta mediante la cuantificación de la cantidad de proteínas, lípidos, contenido de ARN y número de partículas (266).

La presencia de VEs debe ser siempre verificada por la presencia de biomarcadores específicos que incluyen lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. El ISEV recomienda determinar al menos un marcador proteico de la categoría 1, otro de la categoría 2 y otro de la categoría 3 (esta última para evaluar su pureza frente a contaminantes comunes), incluida al menos 1 proteína transmembrana o citosólica (Tabla 12). En esta caracterización de VEs, también es importante proporcionar otra información sobre la estructura y composición obtenida mediante diferentes tipos de microscopía, así como técnicas que aportan parámetros biofísicos como el tamaño (266).

Categoría 1: Proteínas transmembrana o ancladas a GPI asociadas a la membrana plasmática y/o endosomas	
1a: No específicas de tejido	Tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82, CD47), GNA, MHC-I (HLA-A/B/C, H2-K/D/Q), ITGA/ITGB, TFR2, LAMP1/2, SDC, EMPRIN (BSG), ADAM10, NT5E, proteínas de unión al complemento (CD55 y CD59), SHH
1b: Específicas de célula/tejido	TSPAN8 y EPCAM (epiteliales), CD37 y CD53 (leucocitos), PECAM1 (endotelio), ERBB2 (cáncer de mama), CD45 (PTPRC) y CD14 (células inmunes), CD41 (ITGA2B) y CD42a (GP9) (plaquetas), Glicoforina A (GYPA) (RBC), MHC-II (HLA-DR/DP/DQ, H2-A); CD3 (células T), Acetilcolinesterasa/AChE-S y E, y β -amiloides A4/APP (neuronas)
Categoría 2: Proteínas citosólicas	
2a: Con capacidad de unión a lípidos o proteínas de membrana	ESCRT-I/II/III (TSG101, CHMP), ALIX (PDCD6IP), VPS4A/B, ARRDC1, FLOT1/2, CAV, ANXA, HSPA8, HSP90AB1, SDCBP; Tau asociado a microtúbulos (MAPT, neuronas)
2b: Incorporación frecuente	Proteína de choque térmico HSP70 (HSPA1A), actina (ACT), tubulina (TUB) y enzimas (GAPDH)
Categoría 3: Estructuras coaisladas que no son VEs	
3a: Lipoproteínas (producidas por el hígado)	Apolipoproteínas A1/2 y B APOA1/2, APOB; APOB100; albúmina (ALB)
3b: Agregados de proteínas y ácidos nucleicos	Proteína Tamm-Horsfall (uromodulina/UMOD) (orina); proteínas ribosómicas

Tabla 12. Categorías de marcadores que deben analizarse para demostrar la presencia de VEs. Traducido de Théry, C. *et al.*, 2018 (266). **Abreviaciones:** ANXA, Anexinas; CAV, caveolinas; ESCRT, Complejos de clasificación endosómica necesarios para la maquinaria de transporte; FLOT, flotilinas; GAPDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GNA, Proteínas G heterotriméricas; GPI, Glicosilfosfatidilinositol; HSPA8 y HSP90AB1, Proteínas de choque térmico; ITGA, Integrinas; MHC I y MHC II, Complejo mayor de histocompatibilidad I y II; NT5E, 5'nucleotidasa CD73 anclada a GPI; NK, Células *Natural Killer*; RBC, Recuento de glóbulos rojos; SDC, Proteoglicanos de heparán sulfato incluyendo sindecanos; SDCBP, Sintetina; SHH, *Sonic Hedgehog*; TFR2, Receptor de transferrina.

6.2 Internalización de VEs por células diana

Las VEs pueden interactuar sobre las células receptoras de manera autocrina, o sobre otras células de manera paracrina o endocrina mediante señalización mediada por receptores, macropinocitosis, fagocitosis, caveolas o endocitosis induciendo la señalización celular tanto por proteínas, lípidos o liberando la carga al citoplasma de la célula diana en caso de fusionarse con la membrana de esta (267,268).

Las VEs transportan además moléculas de adhesión que pueden aumentar la unión y absorción de VEs a través de lectinas (268).

6.3 Composición de las VEs

El contenido interno de las VEs se deriva de moléculas y orgánulos que se encuentran en el citoplasma de las células liberadoras (269) y parte de su contenido está relacionada con el microambiente en el que se originan. La mayoría de los estudios sobre la composición de las VEs han identificado una amplia gama de moléculas bioactivas, incluidas proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

ExoCarta (270), EVpedia y Vesiclepedia (271) son bases de datos en las que se describe de forma detallada datos moleculares (lípidos, metabolitos, ácidos nucleicos y proteínas) que se han acumulado de diversos estudios en VEs. A continuación, se describe brevemente algunos de sus componentes más importantes y que se representan en la Figura 14.

6.3.1 Proteínas

Uno de los principales componentes de la superficie de las VEs son las proteínas y es por ello por lo que su uso como marcadores es muy común y necesario tal y como se ha visto anteriormente. Se incluyen proteínas de superficie transmembrana como las tetraspaninas (como CD9, CD63, CD81 y CD82 entre otras) o moléculas responsables de la adhesión celular. Incluso se ha visto que los exosomas que han sido liberadas por células presentadoras de antígenos, presentarán en su superficie proteínas MHC-I y II con capacidad de modular la respuesta inmunológicas (262).

No obstante, las proteínas también se localizan en el interior de las VE, las denominadas proteínas citosólicas, que transportan moléculas que participan en la traducción de señales (como HSP70 y HSP90), en la liberación de VEs (como ALIX y TSG101) y en el transporte y fusión con la membrana (como anexinas o proteínas de la familia Rab GTPasas) (266,272).

Otras proteínas por destacar serían las transductoras de señales, las relacionadas con la adhesión celular, las enzimas metabólicas y las quimioquinas y citoquinas.

6.3.2 Lípidos

Como las VEs se derivan de las membranas lipídicas de las células, los lípidos son el cargo de las VEs más estudiado e informado en la literatura, como es la fosfatidilserina, la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la esfingomiélin, el colesterol y los glicolípidos. Se han catalogado más de 1.900 moléculas lipídicas identificadas en aislados de VEs según revisiones recientes (273–275).

Es importante destacar que estos lípidos, aparte de encapsular la carga de las VEs, pueden afectar la función de sus células diana mediante la activación directa de receptores de la superficie celular o como mensajeros secundarios (256).

6.3.3 Ácidos nucleicos

Las VEs pueden transportar ADN incluyendo el nuclear, el mitocondrial y el viral y muchas especies de ARN como el circular, el mitocondrial, el de inferencia, el ribosomal, el condicional pequeño, el nuclear pequeño, el nucleolar pequeño, el pequeño derivado de transferencia, el de cadena larga no codificante, el de la partícula de reconocimiento de señal y los pequeños no codificantes (276) (Figura 14).

Las observaciones iniciales de que la carga de VEs contiene ARN (277), lanzaron el campo de los ARN extracelulares (exARN). La distribución de los exARN depende del origen, estímulo y condición fisiológica celular y la diversidad puede atribuirse incluso a la preparación de las muestras, los métodos de purificación de VEs y ARN, técnicas de estudio de ARN y la plataforma de secuenciación utilizada (276).

En concreto, existe un creciente interés en la detección de fragmentos de ARNm y ARNnc (ARN no codificante) para seguir la trayectoria de varias enfermedades ya que parecen reflejar mejor la célula de origen (278). Es aquí donde se incluyen los microARNs (miRNA en inglés), un tipo de ARNnc monocatenario de 17 a 24 nucleótidos, que constituye la especie de ARN más abundante en las VEs, cuya capacidad de transporte entre células dentro de VEs (exomiARNs) se demostró en 2007 (279). Estos exomiARNs son en parte responsables de la implicación de las VEs en la comunicación celular por su implicación en la regulación epigenética de la expresión de genes, tal y como se desarrollará posteriormente en el apartado 6.

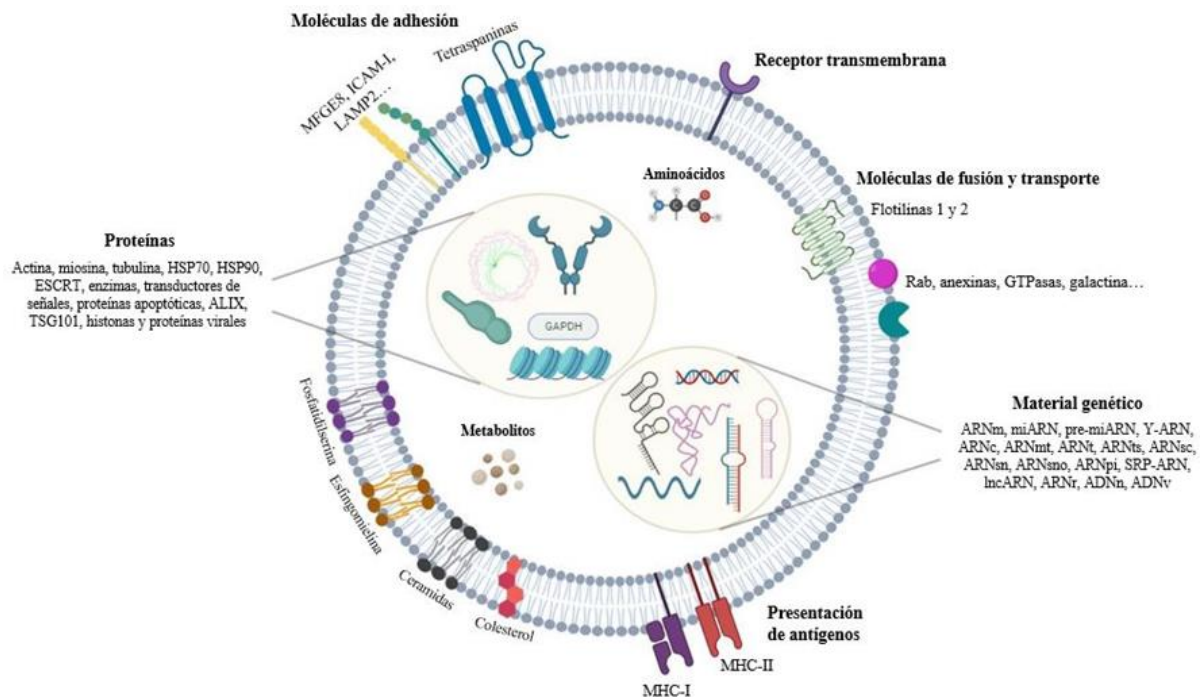


Figura 14. Composición y cargo de las VEs. Basado en Zheng, C. *et al.*, 2022 (280). Creado con Biorender.com.
Abreviaciones: ADN, ácido desoxirribonucleico; ADNn, Ácido desoxirribonucleico nuclear; ADNv, Ácido desoxirribonucleico viral; ARN, ácido ribonucleico; ARNc, ARN circular; ARNmt, ARN mitocondrial; ARNpi, ARN pequeño de interferencia; ARNr, ARN ribosomal; ARNsc, ARN condicional pequeño; ARNsn, ARN nuclear pequeño; ARNsno, ARN pequeño nucleolar; ARNts, ARN pequeño derivado de transferencia; CAMs, Moléculas de adhesión celular; GTPasas, Trifosfatasa de Guanosina; ICAM-I, Molécula de adhesión intercelular 1; LAMP2, Glicoproteínas de membrana asociadas a lisosomas; lncARN, ARN de cadena larga no codificante; MFG8, Milk Fat Globule EGF And Factor V/VIII Domain Containing; miARN, microARNs; pre-miARN, microRNA premaduro; Ras, Miembro de la superfamilia Ras de proteínas G monoméricas; SRP-ARN, ARN de la partícula de reconocimiento de señal; Y-ARN, ARN pequeños no codificantes.

6.4 VEs en el lenguaje cruzado cáncer-estroma y efectos sobre el tumor

Las VEs derivadas de células tumorales, así como las secretadas por células circundantes al tumor, pueden modular las células cancerosas y el microambiente tumoral en general (281).

En la Tabla 13 se resumen VEs de diferentes orígenes y el efecto que se ha descrito que ejerce en la célula diana.

Efecto celular	Fuente de las VEs o Condición	Vía/mecanismo de acción	Efecto/s en célula/s diana/s
Apoptosis/antiapoptosis	ADMSC	Vía Hippo (regula factores de transcripción implicados en crecimiento y supervivencia celular)	Proteger a las células de cáncer de mama de la apoptosis inducida por el tratamiento con 5-fluorouracilo (282)
	Obesidad	Cambios en el contenido	Proteger a las células tumorales de la apoptosis y aumentar su progresión (281)
	Células cancerosas	Ligando Fas	Citotoxicidad y apoptosis de células T y NK (283)
	TA	METTL7A	Proteger a las células de mieloma múltiple de la apoptosis inducida por la quimioterapia (284)
Proliferación	ADMSC	COLGALT2	Proliferación y crecimiento de células de osteosarcoma metastásico (285)
	TA	Agregación celular y fosforilación de CREB	Proliferación de células de cáncer de mama (286)
	Plaquetas	ND	Proliferación y metástasis en cáncer de pulmón (287)
	Células de cáncer de estómago	Activación de NF-kB en macrófagos	Proliferación de células de cáncer de estómago (288)
	FAC	IL-6	Proliferación y transición EMT de células de cáncer de vejiga (289)
	Células precursoras del TA	Cargo: ADI	Proliferación de células de cáncer de mama (186)
Angiogénesis	ADMSC	Cargo: IL-8, CCL2 y VEGF	Promover la angiogénesis en células endoteliales (290)
	Células de melanoma	Reclutamiento células de melanoma diseminado	Angiogénesis y remodelación de la MEC (291)
	Células madre de glioma	VEGF	Aumentar el potencial angiogénico de las células endoteliales (292)
Invasión y metástasis	ADMSC	EGFR-1, IL-6 y vía JAK/STAT-3	Migración y metástasis de células de cáncer de mama en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 (293)
		Vía Wnt	Migración células de cáncer de mama (294)
		TGF-β/Smad y PI3K/AKT	Migración, EMT e invasión células de cáncer de mama (295)
	CAA	FAO	Migración células de melanoma (296)

Invasión y metástasis	TA	Proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial y FAO	Migración y agresividad del melanoma (297)
		MMP3	Invasión de células de cáncer de pulmón in vitro e in vivo por aumento de la actividad MMP-9 (298)
Energía celular	TA	Enzimas implicadas en el metabolismo de los AG (como la hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa)	Mejorar el metabolismo de los lípidos y la actividad de la cadena respiratoria (296)
	Células de cáncer de pulmón	Cargo: IL-6. Vía STAT3	Lipólisis de los adipocitos (299)
Inmortalidad celular	Células de leucemia	Cargo: ARNm de hTERT	Proliferación de fibroblastos (300)
	TA	Cargo: LEP. Vía: STAT-3	Aumento de la actividad de la telomerasa en células MCF-7 (cáncer de mama) (301)
Destrucción inmune e inflamación	ADMSC	Cargo: STAT-3 fosforilado	Polarización M2 de los macrófagos (mediante aumento arginasa-1 e IL-10) (303)
		Disminución IFN- γ y MHC-II	Inactivación de las células T (304)
	Células de hepatocarcinoma	Vía NF κ B	Fenotipo inflamatorio en los adipocitos (con secreción IL-6, IL-8 y MCP-1) (305)
	Células de cáncer gástrico	Vía NF κ B en macrófagos	Proliferación y migración de células tumorales (288)
	Células cancerosas de vejiga (HT1376), colon (CACO2) y mama (MCF7)	Desfosforilación del ATP y el 5'AMP exógenos para formar adenosina (gracias a la expresión exosomal de CD39 y CD73)	Atenuación de la función de las células T (306)

Tabla 13. Funciones de las VEs en la comunicación cruzada entre el cáncer y el estroma y vías implicadas en el/los efecto/s que supone para el tumor. **Abreviaciones:** CAM, Cáncer de mama; COLGALT2, Procolágeno galactosiltransferasa 2; CREB, Unión de elementos de respuesta cAMP; EGFR, Receptor del factor de crecimiento epidérmico; FAC, Fibroblastos asociados al cáncer; FAO, β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos; METTL7A, Proteína similar a la metiltransferasa 7A; ND, no datos; NK, Células *Natural Killer*; SOX-9, *SRY-box transcription factor 9*.

6.4.1 Lenguaje cruzado CaP-estroma mediante VEs

El CaP no escapa a la comunicación cruzada estroma-tumor comentada y se investiga con objetivo de una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la aparición y el desarrollo de este tipo de tumor (263) (Tabla 14).

Fuente de las VEs	Vía/mecanismo de acción	Efecto/s tumoral/es
Exosomas de DU145 y PC3	Desfosforilación del ATP y el 5'AMP exógenos para formar adenosina (gracias a la expresión exosomal de CD39 y CD73)	Escape inmunológico por atenuación de la función de las células T (306)
Exosomas de DU145	Señalización TGF- β /Smad	Angiogénesis por diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (una característica de los FAC) en estromas humanos y de ratón (307)
	Suprimen la presentación de antígenos tumorales (mediante inducción de la expresión de CD73 en células dendríticas)	Diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea en miofibroblastos provocando invasión <i>in vitro</i> (308)
Exosomas de C4-2B	H-ras y GTPasas	Escape inmunológico <i>in vitro</i> (309)
Exosomas de DU145 y LNCaP	Proteína relacionada con la diferenciación de adipocitos	Reprogramación neoplásica similar al CaP en células madre adiposas humanas (310)
Exosomas de LNCaP	FasL	Diferenciación neuroendocrina en células de CaP resistentes a la castración (311)
Microvesículas de PC3 y LNCaP	MMP9 y MMP14	Inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis de células T (312)
Exosomas de 3T3-F442A (línea celular de adipocitos de ratón)	Regulación positiva de los genes de FAO	Modificación de la acción de fibroblastos que se traduce en alteraciones de la MEC <i>in vitro</i> (313)
Exosomas de adipocitos maduros subcutáneos y viscerales de ratón		
VEs de 3T3-L1 (línea celular de adipocitos de ratón)	ND	Migración e invasión de PC3 (296)
VEs de TA omental y subcutáneo humano	TWIST1/EMT	Proliferación, migración, invasión, reprogramación del metabolismo de la glucosa y quimiorresistencia en PC3 y DU145 (314)
VEs de HAMVEC (línea celular de endotelio microvascular adiposo humano)		
VEs de SV-HFO (línea celular de osteoblastos humanos)	ND	Proliferación, invasión y cambios en la tasa glicolítica en PC-3ML (línea celular de CaP metastásica) (315)
		Supervivencia y crecimiento celular de PC3 (316)

Tabla 14. Funciones de las VEs en la comunicación cruzada entre el CaP y el estroma y vías implicadas en el/los efecto/s que supone para el tumor. Respecto a los estudios con exosomas, algunos autores utilizaron el método de gradiente lineal de sacarosa obteniendo el rango típico de densidad de exosomas (1.1-1.2 g/ml) (306,307); y/o analizaron el tamaño mediante *NanoSight*: <300 nm (307), <300 nm (308), <200 nm (309) o citometría de flujo: 60-500 nm (312); o realizaron ultrafiltración (peso molecular de corte=100.000) tras previa utilización del kit comercial de afinidad *exoEasy* (*Qiagen*) (311). En cuanto al estudio de microvesículas basó su aislamiento en repetidas centrifugaciones y la detección de fosfolípidos procoagulantes típicos en superficie (313). Con relación a los autores que se refieren a VEs de manera genérica, algunos reportaron el tamaño por *NanoSight*: 30-160 nm (314) y 50-300 nm (315). **Abreviaciones:** ND, No Datos.

Cabe destacar que también el TAPP tiene un papel procarcinogénico fruto de sus VEs liberadas (componente celular más representado en su secretoma) (158). En este sentido, se estima que aproximadamente el 27-53% de los pacientes con CaP pueden desarrollar recurrencia bioquímica

después de la PR y podría estar relacionado con la liberación de exosomas del TAPP en el estado obeso. No obstante, no existen estudios hasta la fecha que aborden las VEs secretadas por el TAPP humano y su efecto en la agresividad o progresión del tumor de próstata.

6.5 VEs como biomarcadores y terapia en cáncer

Las VEs constituyen una plataforma multicomponente de biomarcadores (Tabla 15) que podrían ser de utilidad en el diagnóstico de muchos tipos de tumores y sustituir otros métodos más invasivos como la biopsia (256).

Tipo biomarcador	VEs biomarcador	Cáncer	Biofluido	Indicación
ARN	MEG3 (317)	Vejiga	Suero	Diagnóstico, recurrencia
	HOTAIR (318)		Orina	Pronóstico
	MALAT-1 (319)	Pulmón	Suero	Diagnóstico y pronóstico
	lncRNA H19 (320)	Hipofisiario distal		Respuesta terapéutica
	GOLM1, NAA35 (321)	Esofágico	Saliva	Detección temprana, recurrencia, respuesta terapéutica
ADN	RET, HIF2A, VHL, SDH (322)	Neuroendocrino	Suero	Diagnóstico genético
	KRAS G12D, TP53 R273H (323)	Pancreático		
	Niveles de número de copias de ADNmt (324)	Ovario epitelial seroso	Sangre completa y plasma	Diagnóstico
Proteómica	LRG1 (325)	Pulmón	Orina	Diagnóstico
	Fetulina-A , proteínas asociadas con la vía EGFR, resistina y proteína 3 inducida por ácido retinoico (326)	Vejiga		
	CD36, CD44, TPBG, EMMPRIN, CD73 (327)			
	MMP9 (328)	Riñón	Suero y saliva	
	BARF1 (329)	Nasofaríngeo		
	CD63 y caveolina-1 (330)	Melanoma	Plasma	Detección temprana y seguimiento de la progresión
	Receptor de folato α (331)	Ovario		
	CD24, EpCAM, TGF-B1, MAGE3/6 (333, 334)			
	HGF, STAT3, IL-6 (336)	Ovario seroso de alto grado	Suero	Detección temprana

Proteómica	SOX-2, SOX-9 (332)		Fluido de efusión	Agresividad
	GPC1 (337)	Pancreático	Suero	Diagnóstico y pronóstico
	Fibronectina (335)	Mama	Plasma	Detección temprana

Tabla 15. VEs como biomarcadores en fluidos corporales humanos en diferentes tipos de cáncer. **Abreviaciones:** **BARF1**, Proteína secretada por el virus de Epstein-Barr recombinante; **EMMPRIN**, Inductor de metaloproteínasa de matriz extracelular; **EpCAM**, Molécula de adhesión de células epiteliales; **GOLM1**, Proteína 1 de la membrana de Golgi; **GPC1**, Glipecano 1; **HOTAIR**, HOX Transcript Antisense RNA; **KRAS G12D**, Mutación Protooncogén KRAS, GTPasa; **LRG1**, Alfa-2-glicoproteína 1 rica en leucina; **MAGE3/6**, Antígeno 3 asociado al melanoma; **MALAT-1**, Transcripción 1 del adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis; **MEG3**, Maternally Expressed 3; **NAA35**, N-Alfa-Acetiltransferasa 35, Subunidad Auxiliar NatC; **RET**, Protooncogén Ret; **SDHB**, Subunidad B del complejo succinato deshidrogenasa hierro azufre; **TPBG**, Glicoproteína del trofoblasto; **TP53 R273H**, Pérdida de función TP53; **VHL**, Supresor de tumores de Von Hippel-Lindau.

Hace dos décadas surgió la idea de utilizar VEs como vacunas antitumorales (338) dando lugar a ensayos clínicos contra el melanoma en Francia (339) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas en Estados Unidos (340). También se vio que las VEs obtenidas a partir de células dendríticas pulsadas con un antígeno tumoral completo, promovían rechazo del tumor (341) beneficiando a un pequeño número de pacientes (342). Tres años más tarde, surgió en China otro ensayo clínico en fase I donde las VEs del líquido ascítico de pacientes con cáncer de colon se combinaron con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos para estimular la actividad de las células dendríticas antitumorales (343). Las VEs también pueden servir como administradores de fármacos por su baja inmunogenicidad y toxicidad, gran estabilidad en circulación y tejidos, y capacidades intrínsecas de localización (344). Primero las VEs se pueden diseñar a partir de células *in vitro* y después, mediante electroporación, se puede incorporar la carga deseada y limitada a las lesiones cancerosas (345). En este sentido, se están investigando fármacos antiinflamatorios (curcumina) (346); agentes quimioterapéuticos (paclitaxel, doxorubicina y withaferina); y fitoquímicos (345,347,348). No obstante, se está trabajando el abordaje en cuanto a fabricación y seguridad (342).

Otro enfoque en el que se está investigando actualmente es inhibir la producción, liberación, circulación o absorción de las VEs (258).

6.5.1 VEs para el diagnóstico y tratamiento del CaP

La aplicación de VEs con finalidad terapéutica para el CaP es una aproximación muy incipiente que requiere de estudios *in vivo* para que sea posible aplicarlo clínicamente orientando además a cada paciente de manera personalizada, sin embargo, se han realizado varias aproximaciones.

En cuanto al diagnóstico temprano del CaP, se ha detectado que los pacientes con este tumor tienen niveles plasmáticos de exosomas significativamente más altos y de menor tamaño vs personas sanas (aunque necesita validación clínica) (349) y una expresión más elevada de PSA en las VEs plasmáticas

de los pacientes con CaP vs HBP o están sanos (aunque estos últimos menores de 30 años todos ellos) (350). Otros estudios han reportado que las VEs de pacientes con CaP vs controles sanos, exhiben una sobreexpresión de anhidrasa carbónica IX (relacionado con el pH intraluminal (351) y que se asocia a un aumento de algunas proteínas exosomales en sangre u orina (PSMA, PCA3, PSA, PTEN, survivina, p-gp, claudina 3, FABP5, gammaglutamil transferasa, EGFR, las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 1$ de la integrina, la proteína transmembrana 256, y Transglutaminasa 4-adseverina entre otras) (263,352). En este sentido, Cho S *et al.*, han desarrollado una nanoplataforma en la que se detectan al mismo tiempo proteínas de superficie de VEs y miARNs (353) e incluso los autores Wang Y *et al.*, proponen el uso de un biochip que podría utilizarse para el diagnóstico de pacientes con CaP (354).

En lo que respecta al tratamiento del CaP, hay un estudio que propone la administración de ARNpi mediante VEs aisladas de la línea celular HEK293T, bloqueando así la metástasis y el crecimiento tumoral *in vitro* de células C42B y DU145 e *in vivo* mediante modelos de ratones utilizando xenoinjertos (355). En otros estudios, la inclusión de ARNpi en VEs aisladas de células de CaP DU145, parece regular la adhesión y migración *in vitro* de otra línea celular de CaP más agresiva, las células PC3 (356). En cuanto a la administración de fármacos en VEs, se ha probado que el paclitaxel administrado en microvesículas y exosomas sobre células LNCaP y PC3 mejora el efecto citotóxico *in vitro* (357).

7. ExomiARNs y cáncer

En 1993 se descubrió la presencia de un ARN de pequeño tamaño, origen endógeno y con función reguladora en *Caenorhabditis elegans* (358) y no fue hasta 2001 cuando surgió la denominación miARN (*miRNA* en inglés) (359). El método estándar de nomenclatura se recoge en la base de datos denominada miRBase (360). Los miARNs se unen de forma complementaria a diferentes ARNm diana por la región 3'UTR (*untranslated region*) e inhiben su expresión a nivel postranscripcional (157). Un único miARN normalmente regula varios genes diana, al mismo tiempo que un mismo gen puede estar regulado por múltiples miARNs (361). Está bien reportado que los miARNs transportados entre células en VEs, que denominados exomiARNs de aquí en adelante, pueden transferirse a células inmunitarias (362), cancerosas (363) o endoteliales (364). En el cáncer en concreto, la primera evidencia de la participación de los miRNAs fue el estudio del papel de miR-15 y miR-16 en la leucemia linfocítica crónica tras ver que sus genes se encuentran dentro de una pequeña región del cromosoma 13q14 que está delecionada en más del 65% de estos pacientes correlacionándose con una regulación negativa de la expresión de ambos miRNAs que regulan la patogénesis de células B (365). A partir de aquí, el número de estudios que relacionan miRNAs con la patogénesis del cáncer ha ido aumentando considerablemente.

7.1 Biogénesis y empaquetamiento de los miARNs

El proceso de biogénesis de los miARNs comienza con la transcripción de los genes de miARNs por la ARN Polimerasa II dando lugar al Pri-miARN, reconocido y procesado por la endorribonucleasa III Droscha que forma un complejo con su cofactor DGCR8 (Gen 8 de la Región crítica del síndrome de DiGeorge) introduciendo un corte y formando el pre-miARN.

El transporte activo del pre-miARN desde el núcleo al citoplasma, lo realiza la *Exportin-5* dependiente de Ran-GTP, donde es cortado en cada hebra dando lugar al miARN dúplex gracias a DICER (endorribonucleasa tipo III) en colaboración con la TRBP (Subunidad TARBP2 del complejo de carga RISC) y PACT (Activador de proteínas de la proteína quinasa inducida por interferón). Por último, la proteína AGO (Componente catalítico Argonauta RISC) libera la hebra pasajera que corresponde al miARN maduro, formando así el miRISC (Complejo silenciador inducido por miARN), encargado de dirigir el miARN hasta su ARNm diana (366) (Figura 16).

En cuanto al empaquetamiento de los miARNs en las VEs, se postulan varios mecanismos: un aumento de Esfingomielinasa 2 (367); el reconocimiento de la proteína ribonucleoproteína nuclear heterogénea de algunas secuencias del extremo 3' (368); K-ras; y la activación del inflammasoma. También los miARNs con una alta concentración en el extremo 3' de uracilo (369) son candidatos, mecanismo controlado también por los niveles celulares de sus transcripciones diana (370).

7.2 Herramientas de predicción de dianas de miARNs

La zona de acoplamiento del miARN al ARNm diana de forma complementaria es la “región semilla”, que contiene de 6-8 nucleótidos en el extremo 5' de la hebra del miARN (Figura 15).

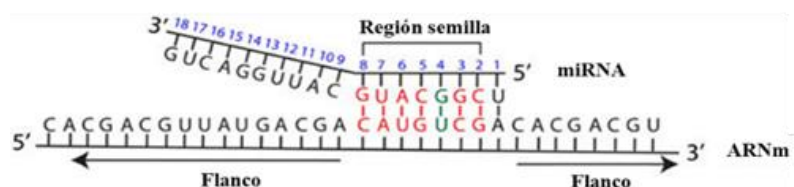


Figura 15. Esquema modelo de la interacción miARN con su ARNm diana. Adaptada de Peterson, S. *et al.*, 2014 (371).

Esta unión miARN-ARNm, se reporta informáticamente en bases de datos basadas en algoritmos de predicción atendiendo al grado de complementariedad de la región semilla, la energía libre de unión, el contenido de repeticiones AU, la accesibilidad de la estructura secundaria del miARN, la abundancia de sitios de unión en el RNAm diana y el grado de conservación evolutiva de las secuencias (372). Estas bases de datos disponibles son: STarMIR, miRanda-mirSVR, TargetScan, DIANA-microT-CDS, MirTarget2, RNA22-GUI, TargetMiner, SVMicrO, PITA, RNAhybrid y miRWalk (373,374).

No obstante, este análisis miARN-ARNm obtenido *in silico* debe ser validado experimentalmente para confirmar si la interacción/es encontrada/s es real. Para ello hay varios métodos: sobreexpresar transitoriamente miARNs artificiales mediante *mimics* o en co-transfección con un sistema de expresión

de luciferasa conjugada a la región 3'UTR del gen diana, inhibir miARNs endógenos mediante *antimiRs*, analizar mediante *microarray* la interacción miARN-ARNm o inmunoprecipitar complejos proteína AGO-miARN-ARNm y posteriormente secuenciar por *HITS-CLIP* (secuenciación de alto rendimiento de ARN aislado mediante inmunoprecipitación entrecruzada) (375,376).

7.3 ExomiARNs y su participación en el desarrollo del cáncer

Los exomiARNs están involucradas en cada paso del desarrollo del cáncer desde el inicio donde las células epiteliales intentan prevenir el crecimiento de células precancerosas (como miR-143 en CaP) (377), hasta el punto en el que las células cancerosas escapan de esta inhibición gracias a exomiARNs que promueven la inflamación (como miR-203 en cáncer de páncreas) (378), la EMT (como miR-200 en cáncer de mama) (379), la migración, la angiogénesis, la superación de la hipoxia y la falta de nutrientes (como miR-1227, miR-210 y miR-9 en cáncer de pulmón, melanoma, páncreas, glioblastoma y colorrectal) (380,381) y la diseminación metastásica de las células endoteliales (como miR-105, miR-21 y miR-29a en cáncer de riñón y mama) (382,383).

Cabe destacar que estos estudios han sido realizados en ratones y modelos *in vitro* (líneas celulares tumorales).

En la Tabla 16 se listan estudios que demuestran la implicación de los exomiARNs en procesos cancerígenos en diversos tumores cuyo origen es diverso.

Tipo de tumor	exomiARNs	Origen	Efecto/s celular observado/s
Mama	miR-148b	Adipocitos viscerales y subcutáneos humanos	Supresión tumoral vía TGF- β y Wnt/ β -catenina (salvo en obesidad) (384)
	miR-140	Preadipocitos de ratón (3T3L1, MBA-1)	Tumorigénesis mejorada en etapas tempranas mediante el eje SOX2/SOX9 <i>in vitro</i> y en ratón (302)
	miR-122	Líneas celulares de cáncer de mama (MCF7; MCFDCIS; MDA-MB 361, 468 y 231; BT474 y SKBR3)	Supresión de la absorción de glucosa por células no tumorales en el nicho premetastásico mediante regulación negativa de PKM <i>in vitro</i> y en ratones (385)
	miR-221 y miR-222	Línea celular tumoral MCF-7	Resistencia al tamoxifeno mediante la regulación de CDKN1B y ER α <i>in vitro</i> (línea celular MCF-7) (386)
	miR-134	Línea celular tumoral Hs578T	Resistencia a fármacos anti-HSP 90 por reprimir STAT5B, HSP90 y BCL2 <i>in vitro</i> (línea celular Hs578T) (387)
Hígado	miR-122	ADMSC humanas	Inhibición del crecimiento del carcinoma y aumento de sensibilidad a la quimioterapia en modelos de xenoinjerto de ratón (388)
	miR-4429 y miR-23b	TA visceral humano	Sensibilidad a sorafenib al reprimir la ciclina G1, ADAM10 e IGF1R <i>in vitro</i> (línea celular HepG2) (388)
	miR-23a y miR-23-b	Adipocitos 3TL	Desregulación TGF- β en células estrelladas hepáticas y en la línea celular HepG2 (389)
			Crecimiento, migración y quimiorresistencia mediante el eje VHL/HIF <i>in vitro</i> y en ratón (390)

Ovario	miR-4792 y miR-320b	ADMSC humanas	Apoptosis <i>in vitro</i> (líneas celulares A2780 y SKOV-3) (391)
	miR-21	CAA y FAC humanos	Motilidad, invasión y resistencia al paclitaxel al unirse a APAF1 <i>in vitro</i> (SKOV3 y OVCA432) y en ratón (392)
	miR-433	Línea celular tumoral A2780	Resistencia a paclitaxel mediante represión CDK6 <i>in vitro</i> (líneas celulares PEO1 y PEO4) (393)
Glioma	miR-146b	Células del estroma de la médula ósea de ratas	Inhibición de la proliferación tumoral <i>in vitro</i> (línea celular 9L) e <i>in vivo</i> (xenoinjerto de glioma de ratas) mediante silenciamiento de EGFR (394)
Nasofaríngeo	miR-24-3p, miR-891a, miR106a-5p, miR-20a-5p y miR-1908	Línea celular tumoral TW03	Alteración de la proliferación y diferenciación de linfocitos T al regular negativamente la vía MARK1 <i>in vitro</i> (395)
Pulmón	miR-100-5p	Línea celular tumoral A549 modificada con resistencia a Cisplatino	Quimiorresistencia al cisplatino en células sensibles actuando sobre mTOR <i>in vitro</i> (línea celular A5449) e <i>in vivo</i> (ratón) (396)
Estómago	miR-21	Macrófagos M2 murinos derivados de la médula ósea	Supresión de la apoptosis y quimiorresistencia al cisplatino al actuar sobre la vía PI3K/AKT y PTEN en la línea celular MGC-803 (397)
	miR-155-5p	Línea celular tumoral MGC-803 modificada con resistencia a paclitaxel	Transición EMT y quimiorresistencia al paclitaxel al suprimir GATA3 y TP53INP1 <i>in vitro</i> (línea celular sensible MGC-803) (398)
	miR-155	Línea celular tumoral Panc1 modificada con resistencia a gemcitabina	Resistencia a la gemcitabina al reprimir la traducción de TP53INP1 <i>in vitro</i> (líneas celulares sensibles de adenocarcinoma ductal pancreático) e <i>in vivo</i> (xenoinjerto de ratón y tejido tumoral pancreático humano) (399)
Páncreas	miR-210	Células madre tumorales resistentes a gemcitabina aisladas de la línea celular BxPC-3	Resistencia a la gemcitabina al actuar sobre el ciclo celular mediante Mtor <i>in vitro</i> (líneas celulares sensibles BxPC-3 y PANC-1) y en ratón (399)
	miR-365	Macrófagos peritoneales murinos	Resistencia a la gemcitabina <i>in vitro</i> (líneas celulares PDACK989, NIH-3T3 y Mia PaCa2) y en ratón (400)
Cabeza y cuello	miR-196a	FAC humanos	Proliferación y resistencia al cisplatino mediante CDKN1B e ING5 <i>in vitro</i> (líneas celulares HN4, HN6 y HN30) e <i>in vivo</i> (xenoinjerto de ratón) (401)
Mieloma múltiple	miR-135b	Líneas celulares de mieloma múltiple (RPMI8226, KMS-11, U266)	Angiogénesis mediante HIF-1 <i>in vitro</i> (línea celular endotelial HUVEC) e <i>in vivo</i> (matrigel traspantada en ratón) (402)

Tabla 16. ExomiARNs de varias fuentes celulares relacionados con diversos procesos cancerígenos en diferentes tipos de tumor. **Abreviaciones:** ADAM10, Dominio 10 de metalopeptidasa; APAF1, Factor activador de peptidasa apoptótica 1; BCL2, Regulador de apoptosis BCL2; CDKN1B, Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B; CDK6, Quinasa 6 dependiente de ciclina; FADD, Fas asociado a través del dominio de muerte; GATA3, Proteína de unión a GATA 3; IGFR1, Receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina; ING5, Inhibidor del crecimiento Miembro de la familia 5; MARK1, *Microtubule Affinity Regulating Kinase 1*; PKM, enzima glucolítica piruvato quinasa; STAT5B, Transductor De Señal Y Activador De Transcripción 5B; TP53INP1, *Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1*.

7.3.1 ExomiARNs y CaP

La expresión anormal de exomiARNs (desencadenada por modificaciones cromosómicas, biogénesis aberrante y regulación epigenética alterada), se ha relacionado con el CaP y se han asociado a procesos epigenéticos de regulación de la proliferación, la apoptosis, la EMT y la metástasis (366).

En la Tabla 17 se resumen los exomiARNs derivados de diferentes fuentes del CaP (líneas celulares o fluidos) y el efecto celular y/o posible diana (gen). A pesar de que se han descrito muchos exomiARNs en este tipo de tumor, escasean estudios que revelen exomiARNs procedentes de muestras humanas de pacientes con CaP (tejidos y biofluidos).

exomiARNs	Origen	Efecto/s celular observado/s en CaP
miR-375	LNCaP	Incremento de la actividad de osteoblastos <i>in vitro</i> (línea celular de osteoblastos hFOB1.19) (403)
miR-3176, -141-3p, -5004-5p, -16-5p, -3915, -488-3p, -23c, -3673 y -3654	Aislado y corroborado en DU-145 y PC-3	Regulación de la expresión del AR y PTEN (404)
miR-32-5p, -141-3p, -606, -381 y -429		Regulación de la expresión de factores de células T (404)
miR-125-a	DU-145	Supresión de la proliferación mediante regulación de AKT1 <i>in vitro</i> (macrófagos de ratón RAW264.7) (405)
miR-940	C4-2B	Diferenciación osteogénica de líneas de células madre mesenquimales humanas <i>in vitro</i> e inducción de lesiones osteoblásticas extensas en el microambiente metastásico óseo <i>in vivo</i> (ratón) (406)
miR-21	PC-3	Promoción de metástasis <i>in vitro</i> (línea celular de osteoblastos hOB) (407)
miR-7-5p, -203a-3p, -193b-3p, -34a-5p, -324-5p, -219a-5p, -497-5p, -744-5p, -193a-5p, -200c-3p, -195-5p, 148a-3p, -28-3p, -1972	PC3 y LNCaP	Proliferación y agresividad tumoral mediante la regulación de TNRC6B, TNRC6A, AGO1, AGO3 y CDK6 según análisis <i>in silico</i>
miR-92a-1-5p	MDA PCa 2a/2b	Diferenciación de osteoclastos e inhibición de osteogénesis mediante COL1A1 <i>in vitro</i> (línea celular precursora de osteoblastos MC3T3-E1) e <i>in vivo</i> (ratón) (408)
miR-141-3p		Metástasis osteoblástica <i>in vitro</i> (línea celular de osteoblastos hFOB1.19) e <i>in vivo</i> (ratón) (371)
miR-143	PNT-2 (línea celular de epitelio prostático no tumoral)	Inhibición del crecimiento celular mediante KRAS <i>in vitro</i> (PC-3MI) (409)
miR-409	Células de estroma prostático humano	Inducción de la proliferación y la EMT <i>in vitro</i> (C4-2B y ARCaP) (410)
miR-21	Adipocitos 3T3-L1	Reducción de la degradación caspasa 3 y quimiorresistencia a la doxorubicina <i>in vitro</i> (PC-3 y DU145) (314)
miR-145	Célula estromal derivada del TA aisladas de TA subcutáneo	Inhibición del crecimiento mediante reducción de BclxL <i>in vitro</i> (PC-3) (411)

miR-1246	Suero	Inhibición de la EMT, la proliferación celular, la supervivencia y promoción de la apoptosis mediante la inhibición de CDH2, VIM y ZEB1 <i>in vitro</i> (LNCaP, DU145 y PC-3) (412)
miR-34-a	Orina	Progresión y mal pronóstico mediante la regulación de Bcl-2 y resistencia al docetaxel <i>in vitro</i> (22Rv1, PC3 y DU145) (413)
miR-146a	Células COS-7 (líneas celulares similares a fibroblastos)	Inhibición del crecimiento celular mediante ROCK1 <i>in vitro</i> (PC-3MI) (363)
miR-27a	PSC-27 (línea celular de fibroblastos)	Resistencia a cisplatino y doxorubicina mediante p53 <i>in vitro</i> (PC-3) (414)

Tabla 17. ExomiARNs relacionados con procesos proliferativos, invasivos y metastásicos, de modulación del sistema inmune y de respuesta a tratamiento en el contexto del CaP. **Abreviaciones:** **AGO1**, Componente catalítico Argonauta RISC 1; **AGO3**, Componente catalítico Argonauta RISC 3; **AKT1**, AKT Serina/Treonina Quinasa 1; **CDH2**, Cadherina 2; **COL1A1**, Cadena Alfa 1 de Colágeno Tipo I; **KRAS**, Protooncogén KRAS, GTPasa; **ROCK1**, *Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1*; **TNRC6A**, Gen 6A que contiene repeticiones de trinucleótidos; **TNRC6B**, Gen 6B que contiene repeticiones de trinucleótidos.

7.4 Aplicaciones clínicas de los exomiARNs en cáncer: diagnóstico, pronóstico y abordaje terapéutico

El uso de exomiARNs como biomarcadores de diversos tipos de cáncer (Tabla 18) tiene como finalidad entre otras la detección temprana. Así, la elección del tratamiento podría ser personalizada basándose en las características de cada paciente y su tumor. Estos exomiARNs al encontrarse en el interior de las VEs, son más estables ya que están protegidos de la degradación (415,416). Además, permiten una detección no invasiva puesto que requiere biofluidos para su aislamiento y de técnicas poco costosas como la PCR cuantitativa en tiempo real (417). Sin embargo, los exomiARNs como biomarcadores aún se encuentran en la etapa inicial de descubrimiento/desarrollo (417) puesto que requiere cohortes de validación para poder ser aplicados a la práctica clínica debido a limitaciones como un menor número de pacientes sanos vs enfermos en el estudio y/o un tamaño muestral pequeño (estudios expuestos en la Tabla 18).

Sin embargo, los biomarcadores de miARN exosomales aún se encuentran en la etapa inicial de descubrimiento/desarrollo y su valor potencial en el diagnóstico clínico espera ser explorado por completo. Es seguro que futuras investigaciones para identificar los nuevos miARN, sus funciones biológicas y sus genes diana aumentarán nuestro conocimiento sobre las funciones de los miARN en la tumorigénesis y garantizarán el desarrollo de pronóstico, diagnóstico y tratamiento del cáncer relacionados con los miARN

En la Tabla 18 se muestran algunos ejemplos de exomiARNs con posible utilidad para el pronóstico y/o diagnóstico de algunos tumores.

Tipo de tumor	exomiARNs	Biofluido	Indicación
Esofágico	↑ miR-21 (370)	Suero	Diagnóstico y pronóstico
Carcinoma oral de células escamosas	↓ miR-375 (368)	Mucosa oral	Detección temprana
Colon	↓ miR-4772-3p (418)	Suero	Recurrencia en estadio II y III
Glioblastoma	↑ miR-21 (419)	Suero	Diagnóstico

Pulmón	↓ miR-378a, ↑ miR-379, ↑ miR-139-5p, ↑ miR-200-5p (420)	Plasma	Diagnóstico
Hígado	↑ miR-21 (421)	Suero	
Cervical	↑ miR-21, ↑ miR-146a (422)	Lavados cervicovaginales	

Tabla 18. Ejemplos de exomiARNs con utilidad pronóstica y/o diagnóstica en diferentes tumores.

La regulación de la epigenética a través de los exomiARNs les confiere un enorme potencial terapéutico en oncología, mediante la utilización de *mimics* (para aumentar su expresión) o de *antimiRs* (para inhibirla) (278). Este campo, aún está en una etapa temprana, pero se pueden encontrar algunos estudios en diferentes fases clínicas de desarrollo (Tabla 19).

Tipo de tumor	Agente terapéutico	Compañía	Estado	Efecto/s
Cerebro	AntimiR de miR-10b	<i>Regulus Therapeutics</i>	Preclínico	↓ Proliferación ↑ Muerte celular
Hígado	AntimiR de miR-221		Preclínico	↓ Progresión tumoral ↑ Supervivencia
Linfoma cutáneo de células T y leucemia linfocítica crónica y de células T	MRG-106 (AntimiR-155)	<i>miRagen Therapeutics</i>	Fase II	↓ Proliferación celular aberrante ↓ Sobreexpresión miARNs
Mesotelioma pleural maligno y pulmón no microcítico	MesomiR-1 (<i>mimic</i> del miR-16)	<i>Asbestos Diseases Research Foundation</i> y <i>EnGeneIC Limited</i>	Fase I multicéntrica terminada	↓ Crecimiento tumoral
Pulmón de células pequeñas, linfoma, hígado, melanoma, mieloma múltiple y riñón	MRX34 (<i>mimic</i> de miR-34)	<i>MiARN Therapeutics, Inc</i>	Fase I multicéntrica terminada	↓ Oncogenes y proliferación ↑ Supervivencia

Tabla 19. Ensayos clínicos de miARNs como terapia contra el cáncer. Adaptado de Rupaimoole, R. *et al*, 2017 (423).

7.4.1 Aplicaciones clínicas de los exomiARNs en el CaP

Los exomiARNs de biofluidos (sangre, orina y semen) podrían ser útiles para el diagnóstico del CaP e incluso permitir dirigir a los pacientes durante la vigilancia activa (424,425). Sin embargo, en la literatura hay contradicciones en los perfiles de expresión identificados, probablemente debido a la falta de métodos estandarizados de aislamiento de VEs y cuantificación de exomiARNs (426). No obstante, siguen siendo prometedores biomarcadores con gran potencial diagnóstico y/o pronóstico del CaP.

En la Tabla 20 se recogen algunos exomiARNs aislados de biofluidos para el diagnóstico/pronóstico del CaP.

Biofluido	exomiARNs	Indicación
Orina	↑ miR-107, ↑ -574-3p (427)	Diagnóstico
	↑ miR-21-5p, ↑ -574-3p, ↑ -141-5p (428)	
	↑ miR-19b (429)	
	↓ miR-196a-5p, ↓ -501-3p (430)	
	↑ miR-21, ↑ -375 ↑ Let-7c (431)	
	↑ miR-145 (432)	

Orina	↑ miR-146a, ↓-34a, ↓-598, ↓-148a (428)	Pronóstico (resistencia al docetaxel)
	↑ miR-2909 (433)	Peor pronóstico
Plasma	↑ miR-200c-3p, ↑ -21-5p (434)	Diagnóstico
	↑ miR-141, ↓-125 (435)	
	↑ miR-217, ↓-23b (436)	
Plasma y suero	↓ Let-7a-5p (434)	Pronóstico
	↑ miR-1290, ↑ -375 (437)	Pronóstico (resistencia tras castración)
Suero	↑ miR-107, ↑ -375 (427)	Pronóstico
	↑ miR-324, ↑ -885, ↓-521 (438)	Diagnóstico
Suero	↑ miR-30, ↑ -126 (439)	
	Semen	↑ miR-1246 (411)
Semen		↑ miR-141, ↑ -375 (427)
	Semen	↑ miR-221, ↑ -222 (440)

Tabla 20. Estudios clínicos que exploran exomiARNs como posibles biomarcadores del CaP.

Las terapias basadas en exomiARNs son prometedoras para revertir las alteraciones patológicas de los miARNs y controlar el CaP.

En este sentido, en la Tabla 21 se muestran varias estrategias terapéuticas basadas en miARNs investigadas en modelos de CaP *in vivo* (sobre animales) o *ex vivo* (usando tejido vivo que ha sido creado de manera artificial en el laboratorio o donado por organismos vivos) y sus efectos.

Estrategia terapéutica	miARN	Modelo estudio	Vía	Vector	Efecto
Inhibición del miARN (AMOs y Antagomir)	miR-221/222	<i>In vivo</i>	Inyección intratumoral	—	Inhibición proliferación células PC3
Inhibición del miARN (AMOs LNA)	miR-21	<i>Ex-vivo</i>	—	—	Apoptosis células DU145
Inhibición del miARN (AMOs PNA)		<i>In-vivo</i>	Inyección intravenosa	—	
Inhibición del miARN	miR-141/-375	<i>In-vivo</i>	Intraperitoneal	Nanopartículas PEI	Reducción de crecimiento tumoral derivado de PC3
Inhibición del miARN (esponja de miARN)	miR-767-5p	<i>Ex-vivo</i>	—	—	Inhibición de proliferación e invasión de células resistentes a la enzalutamida
Reemplazo de miARN (<i>mimics</i>)	miR-185	<i>Ex-vivo</i>	—	—	Inhibición migración, invasión y formación de células LNCaP
	miR-34a	<i>In-vivo</i>	Vena de la cola	Nanopartículas de quitosano	Disminución crecimiento del CaP metastásico óseo derivado de PC3 e inducción de autofagia
	miR-145	<i>In-vivo</i>	Inyección intravenosa	PEI conjugada con poliarginina	Disminución crecimiento células PC3 y aumento supervivencia
	miR-15a y -16-1	<i>In-vivo</i>	Inyección intravenosa	ATE conjugado con aptámero	Disminución crecimiento y aumento supervivencia en ratones con metástasis ósea de CaP humano
	miR-145	<i>In-vivo</i>	Inyección intravenosa	<i>Mímic</i> conjugado con poliarginina	Tumores radiosensibilizantes PC3 y LNCaP

Tabla 21. Estudios clínicos que exploran miARNs útiles para terapia en CaP. Adaptado de Gamlouche, F. *et al.*, 2023 (365).
Abreviaciones: **AMOs**, oligonucleótidos anti-miARN; **ATE**, Atelocolágeno; **LNA**, Ácido nucleico bloqueado; **PEI**, polietilenimina de nanopartículas de polímero; **PNA**, ácido nucleico peptídico.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

II. Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta que:

- El TAP tiene un papel relevante en el desarrollo y progresión de algunos tipos de cáncer como el de mama, ovario, mieloma múltiple, colon y endometrio entre otros
- El TAP puede influir en los tejidos cercanos al tumor mediante la secreción de mediadores inflamatorios, proangiogénicos, secreción de AGs y liberación de VEs
- La cantidad/grosor de TAPP medido por diferentes técnicas de imagen se ha asociado con tumores de CaP más agresivos y con el riesgo de recurrencia de estos
- El contenido de exomicroARNs de las VEs secretadas por el TAP, actúan a nivel epigenético en tumores como el de mama e hígado potenciando su agresividad

Postulamos que:

El TAPP tiene un papel relevante en el microambiente del CaP y podría potenciar la agresividad del tumor influyendo en el metabolismo y regulando la expresión génica a través de exomiARNs contenidos en vesículas

Nuestro objetivo principal es:

Estudiar el impacto metabólico y epigenético del TAPP en la agresividad del CaP

Estudio 1

Objetivo Principal: Estudiar la interacción del TAPP en el metabolismo lipídico del CaP y su relación con la agresividad del tumor.

Objetivos Secundarios:

- a) Comparar el perfil lipídico del TAPP derivado de tumores de próstata de bajo riesgo (ISUP I y II) con los de alto riesgo (ISUP III, IV y V) mediante un análisis lipídico no dirigido
- b) Identificar los metabolitos lipídicos asociados a la agresividad del tumor y estudiar su utilidad en el pronóstico del CaP
- c) Identificar las vías metabólicas alteradas asociadas a los metabolitos desregulados
- d) Estudiar *in vitro* la interacción metabólica entre el TAPP y el CaP utilizando líneas celulares de CaP y co-cultivo *ex vivo* mediante:
 1. Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos y agresividad tumoral
 2. Análisis de la acumulación y captación de lípidos

Estudio 2

Objetivo Principal: Identificar y caracterizar funcionalmente el contenido de exomicroARNs de las VEs secretadas por el TAPP al microambiente del CaP.

Objetivos Secundarios:

- a) Aislar y caracterizar las VEs secretadas por el TAPP
- b) Determinar la expresión de exomicroARNs contenidos en las VEs aisladas del TAPP comparativamente con las del tejido adiposo perivesical sano (TAPV)
- a) Analizar *in silico* las posibles dianas genéticas de los exomicroARNs desregulados y las vías metabólicas en la que los genes identificados y las proteínas que codifican están implicadas
- b) Validar *in vitro* las dianas genéticas identificadas para los exomicroARNs candidatos mediante el uso de inhibidores de miARNs y/o silenciadores de genes (siRNAs)
- c) Determinar *in vitro* en líneas de CaP, el efecto celular de la acción epigenética de los exomicroARNs desregulados sobre sus dianas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

III. Resultados

Estudio 1

The lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue reveals alterations in tumor cell's metabolic crosstalk

Altuna-Coy, A.; Ruiz-Plazas, X.; **Sánchez-Martín, S.**; Ascaso-Til, H.; Prados-Saavedra, M.; Alves-Santiago, M.; Bernal-Escoté, X.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R.

BMC Medicine 2022, 20, 255.

Doi: <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02457-3>

Estudio 2

Tumoral periprostatic adipose tissue exovesicles-derived miR-20a-5p regulates prostate cancer cell proliferation and inflammation through the RORA gene

Sánchez-Martín, S.; Altuna-Coy, A.; Arreaza-Gil, V.; Bernal-Escoté, X.; García Fontgivell, G.F.; Ascaso-Til, H.; Segarra-Tomás, J.; Ruiz-Plazas, X.; Chacón, M.R.

Journal of Translational Medicine 2024, 15, 22(1).


Doi: <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05458-3>

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue reveals alterations in tumor cell's metabolic crosstalk

Antonio Altuna-Coy^{1†}, Xavier Ruiz-Plazas^{1,2†}, Silvia Sánchez-Martin¹, Helena Ascaso-Til², Manuel Prados-Saavedra², Marta Alves-Santiago^{1,2}, Xana Bernal-Escoté³, José Segarra-Tomás^{1,2*†} and Matilde R. Chacón^{1*†} 

Abstract

Background: Periprostatic adipose tissue (PPAT) plays a role in prostate cancer (PCa) progression. PPAT lipidomic composition study may allow us to understand the tumor metabolic microenvironment and provide new stratification factors.

Methods: We used ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based non-targeted lipidomics to profile lipids in the PPAT of 40 patients with PCa ($n = 20$ with low-risk and $n = 20$ high-risk). Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and variable importance in projection (VIP) analysis were used to identify the most relevant features of PPAT between low- and high-risk PCa, and metabolite set enrichment analysis was used to detect disrupted metabolic pathways. Metabolic crosstalk between PPAT and PCa cell lines (PC-3 and LNCaP) was studied using ex vivo experiments. Lipid uptake and lipid accumulation were measured. Lipid metabolic-related genes (*SREBP1*, *FASN*, *ACACA*, *LIPE*, *PPARG*, *CD36*, *PNPLA2*, *FABP4*, *CPT1A*, *FATP5*, *ADIPOQ*), inflammatory markers (*IL-6*, *IL-1B*, *TNFA*), and tumor-related markers (*ESRRA*, *MMP-9*, *Twist1*) were measured by RT-qPCR.

Results: Significant differences in the content of 67 lipid species were identified in PPAT samples between high- and low-risk PCa. PLS-DA and VIP analyses revealed a discriminating lipidomic panel between low- and high-risk PCa, suggesting the occurrence of disordered lipid metabolism in patients related to PCa aggressiveness. Functional analysis revealed that alterations in fatty acid biosynthesis, linoleic acid metabolism, and β -oxidation of very long-chain fatty acids had the greatest impact in the PPAT lipidome. Gene analyses of PPAT samples demonstrated that the expression of genes associated with de novo fatty acid synthesis such as *FASN* and *ACACA* were significantly lower in PPAT from high-risk PCa than in low-risk counterparts. This was accompanied by the overexpression of inflammatory markers (*IL-6*, *IL-1B*, and *TNFA*). Co-culture of PPAT explants with PCa cell lines revealed a reduced gene expression of lipid

[†]Antonio Altuna-Coy and Xavier Ruiz-Plazas contributed equally to this work.

[†]José Segarra-Tomás and Matilde R. Chacón are joint senior authors on this work.

*Correspondence: jsegarrahj23.ics@gencat.cat; mrch2424@gmail.com; matilde.rodriguez@iispv.cat

¹Disease Biomarkers and Molecular Mechanisms Group, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, C/ Dr. Mallafre Guasch, 4, 43007, Tarragona, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

metabolic-related genes (*CD36*, *FASN*, *PPARG*, and *CPT1A*), contrary to that observed in co-cultured PCa cell lines. This was followed by an increase in lipid uptake and lipid accumulation in PCa cells. Tumor-related genes were increased in co-cultured PCa cell lines.

Conclusions: Disturbances in PPAT lipid metabolism of patients with high-risk PCa are associated with tumor cell metabolic changes.

Keywords: Periprostatic adipose tissue, Lipidomic, Lipid metabolism, De novo fatty acid synthesis, Prostate cancer

Background

Periprostatic adipose tissue (PPAT) is a specific fat depot that surrounds the prostate and may constitute an important active component in the metabolic tumor interplay, adapting to the metabolic needs of prostate cancer (PCa) cells, thus participating in tumorigenesis and resistance to treatments [1].

Lipid metabolism has been found to be important in PCa [2]. Fatty acid (FA) biosynthesis is dysregulated in PCa [3]. Tumor cells can establish bidirectional crosstalk with adipose tissue, inducing lipolysis and FA release that can be subsequently stored and used by tumor cells [4]. Indeed, cell co-culture studies have shown that PCa cell lines incorporate FA from neighboring isolated adipocytes [5]. Because PCa cells can induce adipocyte lipolysis to increase their intake of FA [6], suppressing FA uptake might be an interesting strategic point for designing future therapies in patients with localized PCa tumors.

Detailed and quantitative studies of the PPAT lipidome are limited and have been focused on fatty acids (FAs), considered important determinants of the lipid composition of adipose tissue [7–10]. PPAT FA profile analysis reported few significant differences only according to the ethno-geographical origin [8], particularly when comparing Caucasian with African-Caribbean where aggressiveness was associated with lower levels of linoleic acid. Others found differences in FA composition when comparing PPAT samples with benign prostate hyperplasia, with higher levels of palmitic in PPAT tissue [7]. Interestingly, a study analyzing basal secreted FA profile from PPAT explants revealed no differences in relation to tumor aggressiveness when patients were dichotomized by Gleason score into less or more aggressive PCa [9].

A deeper characterization of PPAT may lead to a better understanding of the disease and possibly allow new stratification factors. Therefore, in the present study, we aimed to analyze the lipidome of PPAT using an untargeted lipidomic approach. We obtained PPAT samples from patients undergoing radical prostatectomy in an attempt to identify lipid signatures associated with PCa aggressiveness. Additionally, we performed metabolite enrichment and gene expression analysis to identify biologically meaningful patterns and to search for possible

correlations between PPAT lipidomic metabolites and metabolic-related genes. Finally, we performed co-culture experiments to question lipid microenvironment crosstalk.

Methods

Patients and tissues

A total of 40 PPAT samples were obtained during surgical procedures in patients with PCa consecutively treated by radical prostatectomy at the University Hospital Joan XXIII, Tarragona (Spain). The surgery was performed laparoscopically assisted by a *Da Vinci* robot. Once the anterior surface of the prostate had been surgically exposed, the surrounding PPAT surface was removed and 1–2 g of this fat tissue was immediately placed in a sterile container, washed twice in PBS, and stored in vapor phase of liquid nitrogen.

All patients signed an informed consent. Clinical characteristics are summarized in Additional file 1. Patients were stratified based on the International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma [11] as high-risk (III, IV, and V) ($n=20$) and low-risk (I and II) ($n=20$). The study was performed according to the provisions of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee and adhered to current legal regulations (Biomedical Research Law 14/2007, Royal Decree of Biobanks 1716/2011, Organic Law 15/1999 of September 13 Protection of Personal Data). All methods were approved and performed in accordance with guidelines and regulations of the Ethical Committee for Clinical Research (CEIM) from the *Pere Virgili* Research Institute (CEIM205/2020).

Metabolomics multiplatform

To characterize adipose tissue metabolic profiles, FA methyl ester (FAME), acylcarnitine, and lipidomic analysis was carried out using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS/MS), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS), respectively. For lipidomic analysis, two different LC-QTOF-MS-based platforms were used to analyze methanolic tissue extracts (LIP-I)

and chloroform/methanol tissue extracts (LIP-II). The methanol extract platform included free FA, bile acids, steroids, oxylipins, and lysophospholipids (LP). The chloroform/methanol extract platform provided coverage over sphingolipids (SM), monoacylglycerols (MG), diacylglycerols (DG), triacylglycerols (TG), phosphatidylcholines (PC), and ether-phosphatidylcholines (PC-O).

Total FAs were derived from the quantitative analysis of FAME. The acylcarnitine and lipidomic characterizations were performed using internal standards to correct the response of each detected compound based on their family similarity, providing a semi-quantitation as an internal standard response ratio. Specific extraction protocols and mass spectrometry-based analyses are detailed in Additional file 2: Additional Material and Methods.

The number of metabolites obtained by the three different techniques was as follows: LIP-I, $n=120$ lipids; LIP-II, $n=122$ lipids; and FAME, $n=22$.

Ex vivo co-culture of PPAT explants and PCa cell lines

We designed Transwell co-culture assays of PPAT explants (7 low-risk and 3 high-risk) with 2 PCa cell lines. The prostate cancer cell lines PC-3 (androgen-insensitive) and LNCaP (androgen-sensitive) were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). PC-3 cells were cultured in Ham's F-12 K (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, 1% penicillin/streptomycin, and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Plasmocin[®] (Invivogen, IBIAN Technologies, Zaragoza, Spain). Cells were seeded into Transwell 0.4- μm pore size cell culture inserts (Fisher scientific, Barcelona, Spain) at 50,000 cells/ 0.9 cm^2 in the same medium at 37 °C and 5% CO₂ during 24 h. The next day, the medium was exchanged for serum-free medium, for 24 h. Subsequently, 50 mg of fresh PPAT was washed with PBS twice and added to the lower Transwell chamber in 1 mL of M199 medium with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin in 25 mM HEPES. Each sample was tested in duplicate. The co-culture was maintained at 37 °C and 5% CO₂ for 48 h in the same medium. Subsequently, cells and tissue explants were removed, and RNA was extracted.

RNA extraction and real-time gene expression

Total RNA was extracted from 50 mg of either frozen PPAT or fresh PPAT explants (after co-culture) using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD). PC-3 and LNCaP RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Total RNA was quantified by

absorbance measurement, and its purity was assessed by the OD260/OD280 ratio. RNA was retrotranscribed to cDNA using a High Capacity cDNA-to-RNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the following genes were tested using Taqman assays (Applied Biosystems): *SREBP1* (hs01088691_m1), *PPARG* (hs00234592_m1), *FASN* (hs01005622_m1), *ACACA* (hs01046047_m1), *LIPE* (hs00193510_m1), *IL-6* (hs00985639_m1), *IL-1B* (hs01555410_m1), *TNF α* (hs99999043_m1), *CD36* (hs00169627_m1), *FABP4* (hs00609791_m1), *CPT1A* (hs00912671_m1), *PNPLA2* (hs00386101_m1), *FATP5* (hs00202073_m1), *ADIPOQ* (hs00605917_m1), *ESRRA* (hs01067166_g1), *TWIST1* (hs00361186_m1), and *MMP-9* (hs00957662_m1). The value for each sample was normalized to the expression of GAPDH. SDS software 2.3 and RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems) were used to analyze the results with the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). To compare low- versus high-risk, PPAT data were expressed as an n -fold difference relative to a calibrator (a mix of 1 sample of PPAT and 1 sample of abdominal adipose tissue from our Biobanc collection). Co-culture cell lines and co-culture explant PPAT data were expressed as an n -fold difference relative to control.

Lipid uptake and lipid accumulation assays

PCa cells were seeded in 96-well clear flat-bottom black plates (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain) and co-cultured with 10 mg of PPAT for 48 h. To quantify fatty acid uptake, the growth medium was exchanged with TF2-C12 fatty acid (Sigma-Aldrich), and cells were incubated at 37 °C for 30 and 60 min. Cellular uptake was measured on Varioskan Lux Reader (Thermo Fisher Scientific) by measurement of fluorescence intensity (λ exposition = 485/ λ emission = 515 nm). Lipid content was measured with Nile Red (Sigma-Aldrich). Briefly, 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, cells were washed with PBS followed by measurement of fluorescence intensity (λ exposition = 488/ λ emission = 590 nm).

Statistical analysis

For the PPAT study, the sample size was calculated using G*Power 3.1.9.7 (<https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie> [12]). Assuming a change of twofold between groups and similar group variances, with an average power > 80% and a false discovery rate of 5%, a minimum of 17 patients were needed in each group. Variables not normally distributed are presented as medians and interquartile ranges and were compared with the Mann–Whitney U test. Multivariate stepwise backward regression analysis was employed in order to evaluate the independent

predictors associated with PCa aggressiveness. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 22 (SPSS, Chicago, IL). The R software (<https://cran.r-project.org/web/packages/Information/index.html>) was downloaded. To achieve the best discriminatory model between studied groups, we performed variable importance in projection (VIP) score analysis and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) using *MetaboAnalystR* package (<https://github.com/xia-lab/MetaboAnalystR>). Pathway enrichment was performed by using *MetaboAnalyst* 5.0 software (<https://www.metaboanalyst.ca>), and we selected the metabolite set library from SMPDB (The Small Molecule Pathway Database). GraphPad Prism 7.0 was used for the box plot analysis of the different metabolites. For ex vivo experiments, at least 6 co-culture experiments were performed with different human PPAT explant tissues and 2 PCa cell lines. Statistical significance was evaluated with Mann-Whitney tests. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Lipid profiling of PPAT

We performed untargeted lipidomic profiling of 40 PPAT samples using LC-MS/MS and GC-MS/MS platforms. Patients were stratified according to ISUP GG into two categories: low-risk (ISUP groups I and II, $n = 20$ tissues) and high-risk (ISUP groups III, IV, and V, $n = 20$ tissues). Patients' characteristics are summarized in Additional file 1. Of 264 individual lipid metabolites detected, 67 were significantly differentially expressed between low- and high-risk PPAT samples (Additional file 3).

Analysis of total FA profile obtained after FAME analysis (reveals all FA cellular composition, including acyl chains and free fatty acids) showed that the percentage of total saturated FA (SFA) was not different between the low- and high-risk groups whereas a higher percentage of monounsaturated FA (MUFA) was observed in high-risk PPAT tissue when compared with low-risk counterpart's (27.59% vs 28.53%, respectively; $p = 0.001$). Analysis of polyunsaturated FA (PUFA) revealed a significant difference for ω -6 PUFA, which were lower in abundance in high-risk PPAT samples compared with low-risk (17.05% vs 18.98% respectively, $p = 0.001$) (Fig. 1A, Additional file 4).

No changes were observed between the two studied groups for the following metabolites obtained by LIP-II analysis: DG, $p = 0.565$; SM, $p = 0.565$; lysophosphatidylethanolamine (LPE), $p > 0.9$; LPC, $p = 0.873$; PC, $p = 0.155$; and PC-O, $p = 0.337$. By contrast, a significant difference ($p < 0.05$) was detected in the total levels of lysophosphatidylinositol (LPI), which were higher in

high-risk PPAT samples. Also, a trend for lower levels of TG ($p = 0.063$) was found in high-risk PPAT samples (Fig. 1B).

Analysis of PPAT lipid signatures for prognosis of PCa

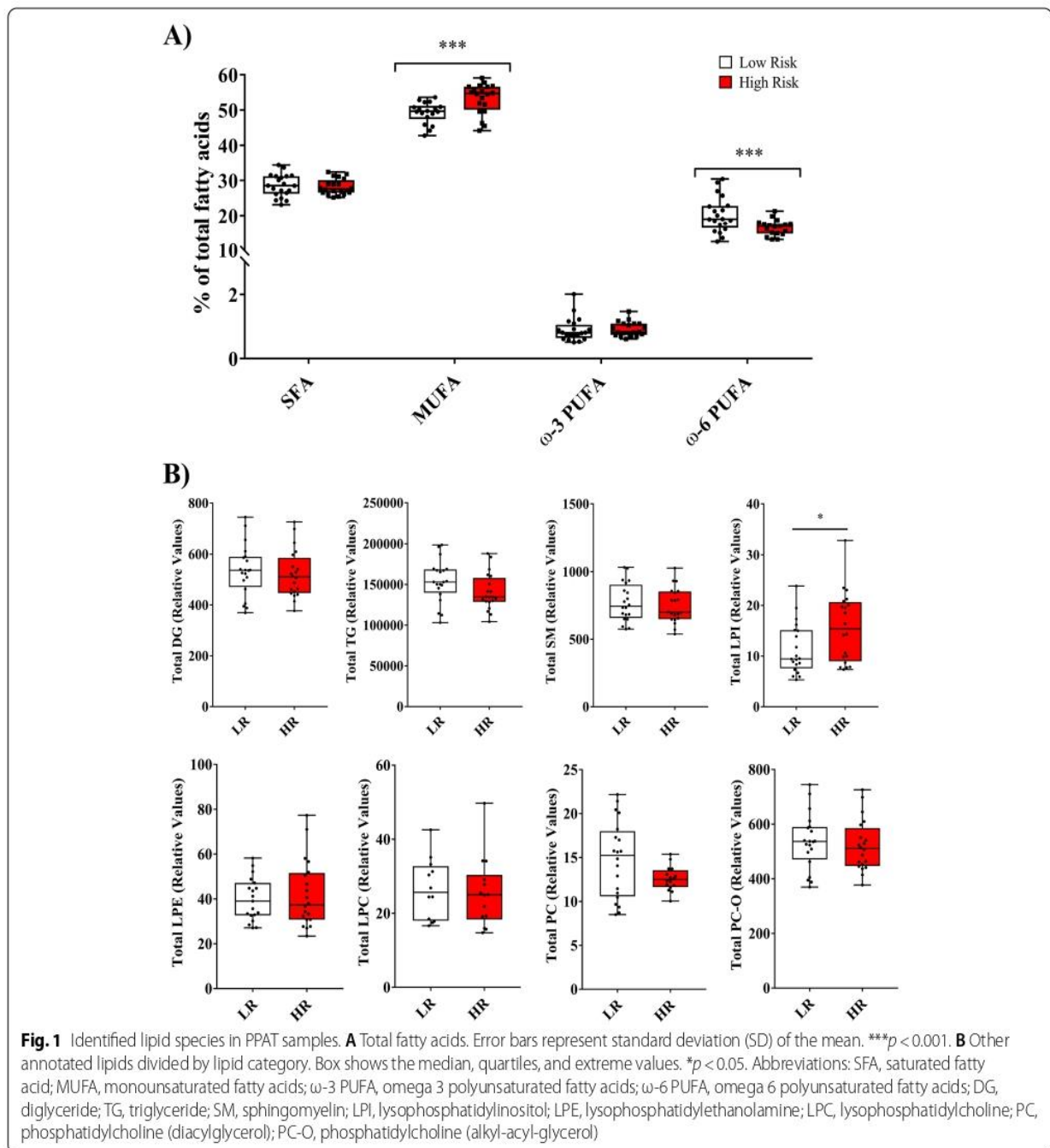
To identify the most relevant lipid features that would allow us to correctly stratify low-risk versus high-risk patients based on the PPAT lipid profile, we performed PLS-DA on a data set of 70 variables (including the 67 significantly deregulated lipid metabolites shown in Additional file 3 and we also included the variables total SFA, total MUFA, and total PUFA). The score plot of the PLS-DA model showed a separation between patients regarding PCa aggressiveness (Additional file 5: Fig. S1A). We then performed VIP analysis to examine the contribution of the 70 variables in determining the degree of PCa aggressiveness, finding that 33/70 variables had a VIP score ≥ 1 and were therefore considered as important in the model for determining PCa aggressiveness (Additional file 5: Fig. S1B).

The selected 33 variables were then back evaluated with PLS-DA to test the strength of the model, and again the patients were segregated into two differentiated groups (Fig. 2A). The PLS-DA model over fitting, measured as the Q^2/R^2 ratio (R^2 —how well the model predicts the calibration of variables, and Q^2 —how well the model predicts PCa aggressivity) was 0.59, indicating that the model fitted well (Fig. 2B). A model is considered predictive when the Q^2/R^2 ratio is greater than 0.5 [13]. To obtain the minimum number of significant lipidomic PPAT signatures that could separate the low- and high-risk PCa groups, we performed a second VIP analysis and the model showed that only 16 of the 33 variables had a VIP score ≥ 1 (Fig. 2C). The heat map in Fig. 3 shows that based on these 16 features the PPAT samples, categorized by ISUP grade group, naturally clustered into 2 separate groups corresponding to low- and high-risk PCa.

Multivariate stepwise backward regression analysis with the 16 signatures from VIP panel allowed us to evaluate the independent lipid metabolite predictors associated with PCa aggressiveness. Results showed that 12,13-EpOME ($B = 0.008$, $p = 0.039$, 95% CI = 0–0.779) and MG (18:0) ($B = 0.942$, $p = 0.005$, 95% CI = 0.9–0.982) were independently associated with PCa aggressiveness.

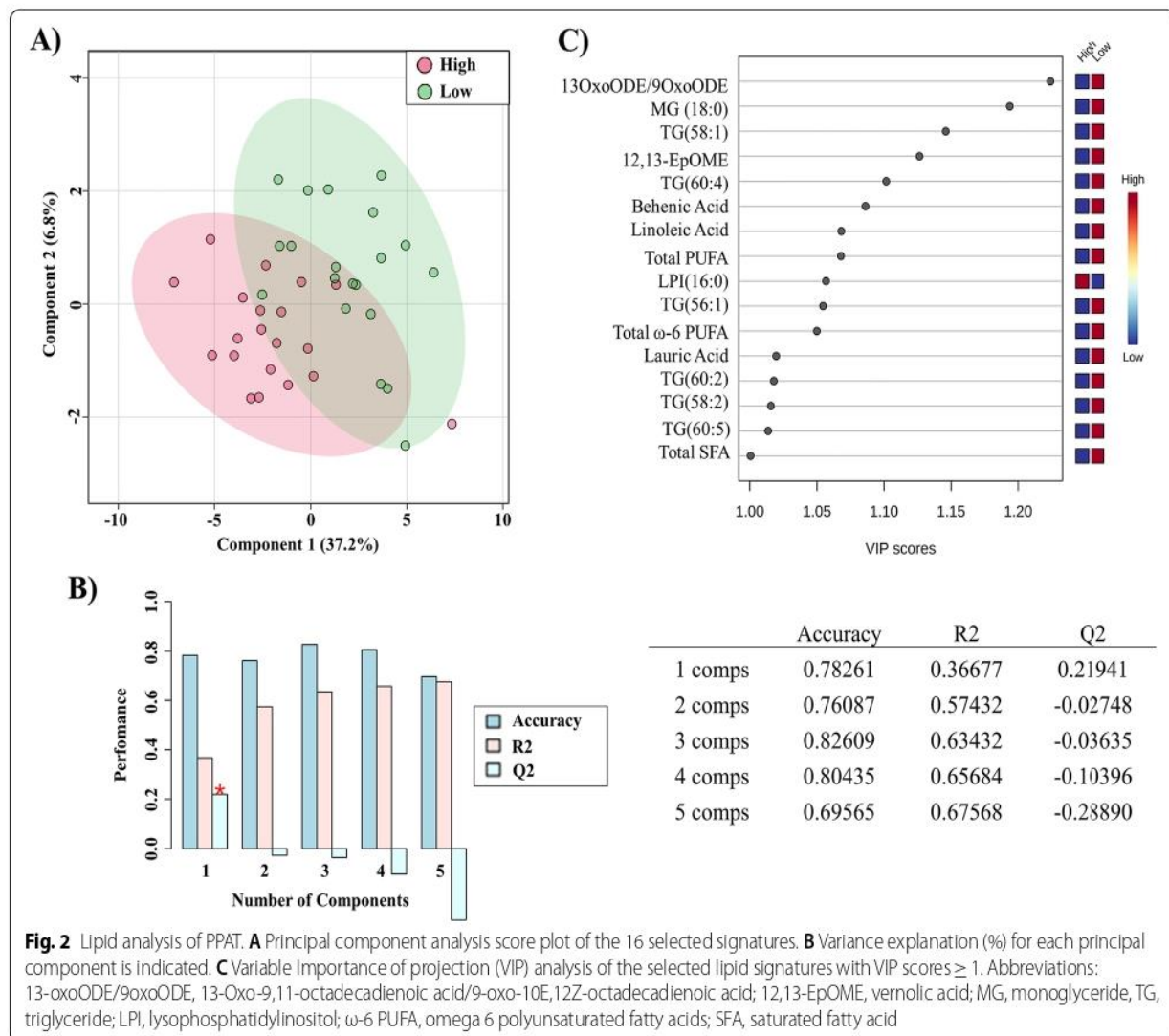
Lipid derangements in PPAT from patients with PCa are related to metabolic alterations

The PPAT lipid signatures revealed an apparent disorder in lipid metabolism according to PCa pathogenesis. To obtain a global overview of the altered metabolic pathways, we performed metabolite set enrichment analysis using *MetaboAnalyst* 5.0 and SMPDB metabolite set



library with the all-lipid metabolites outlined in Fig. 3. These functional approaches revealed that alterations in linoleic acid metabolism, biosynthesis of FA, and β -oxidation of very long-chain fatty acid had the highest impact in the PPAT lipidome (Fig. 4A) ($p < 0.05$). Then, several SFA metabolites' profiles obtained by FAME (Additional file 4) were mapped onto de novo lipid synthesis pathways, and we observed that the amount of

palmitic acid and the total amount of its intermediate products, which may be further elongated to form other FA, showed a gradually decreasing trend when patients were stratified by ISUP group. When samples were grouped into low- and high-risk PPAT, significant differences were observed in the amounts of palmitic acid, stearic acid, arachidic acid, and behenic acid (Fig. 4B).

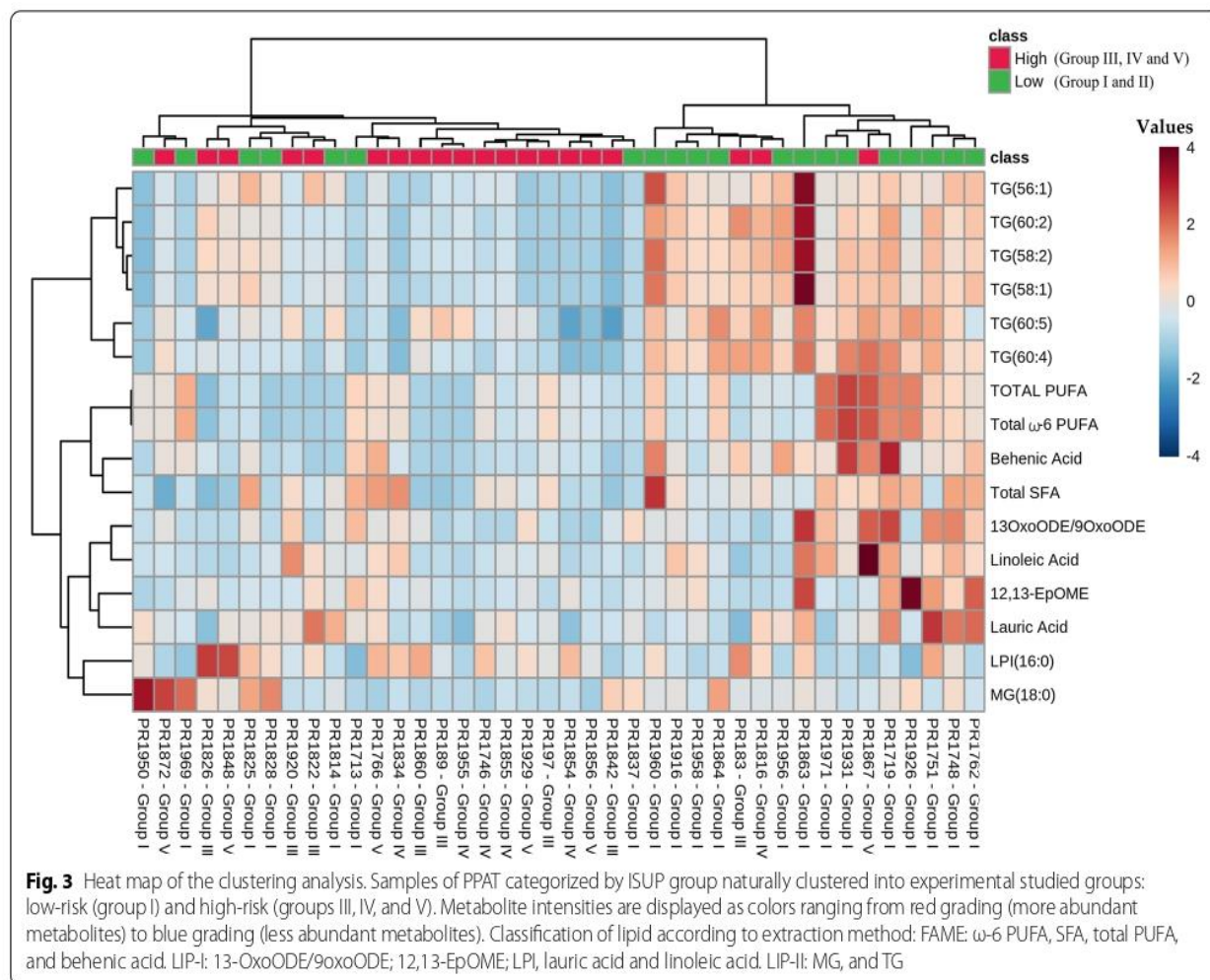


When mapping metabolites related to the linoleic acid pathway, we observed that in general, metabolites showed a gradual decrease when PPAT samples were stratified by ISUP group (Fig. 4C). Significant lower amounts of linoleic acid (LA) only appeared in high-risk PPAT samples when grouped by lower and high-risk PPAT (Fig. 4C). Linoleic acid can be oxygenated by 15-lipoxygenase 1 (LOX-1) in humans, primarily to 13-oxoODE or 9-oxoODE, which were also found to be significantly lower in high-risk than in low-risk PPAT.

Linoleic acid can also be converted by cytochrome P450 to epoxy-octadecenoic acids (EpOMEs) in the form of either 9(10)-EpOME (leukotoxin, coronaric acid) or its regioisomer 12(13)-EpOME (isoleukotoxin, vernolic acid); both metabolites were also lower in abundance in high-risk PPAT than in low-risk PPAT (Fig. 4C).

PPAT from aggressive PCa tumors exhibits an altered gene expression profile related to lipid metabolism and inflammation

We next aimed to determine the specific contribution of selected genes in relation to the altered metabolic pathways. We evaluated the expression of sterol regulatory element binding transcription factor 1 (*SREBP1*), fatty acid synthase (*FASN*), and acetyl-CoA carboxylase (*ACACA*) genes, which are involved in de novo FA synthesis. Levels of *FASN* and *ACACA* were significantly lower in high-risk PPAT (Fig. 5A), whereas levels of *SREBP1* were reduced in high-risk PPAT when compared with low-risk PPAT (Fig. 5B) but did not reach significance. All this data indicates a diminished de novo FA synthesis, in good agreement with the levels of these metabolite pathway products in PPAT (Fig. 4).



Linoleic acid can be converted to 13-OxoODE, which is an endogenous ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*) [14]. When we measured *PPARG* expression levels, we observed a downregulating trend in high-risk PPAT when compared with low-risk PPAT samples (Fig. 5B). This finding can be related to the lower levels of 13-oxoODE in high-risk PPAT (Fig. 4C). A significant reduction in *ADIPOQ* gene expression, a gene directly regulated by *PPARG*, was observed in high-risk PPAT samples when compared with their low-risk counterparts (Fig. 5C).

We also observed that the expression of hormone-sensitive lipase (*LIP*) was significantly lower in high-risk PPAT samples than in low-risk samples (Fig. 5D), which has also been described in breast cancer-associated adipocytes [4].

Interestingly, we also revealed an altered inflammatory state in high-risk PPAT samples, demonstrated predominantly by the significantly higher expression of the proinflammatory cytokine interleukin 6 (*IL-6*) in addition to a trend for higher levels of interleukin 1 (*IL-1B*) and tumor necrosis factor alpha (*TNFα*) (Fig. 5E).

Ex vivo co-culture of PPAT explants with PCa cell lines triggers changes in the expression of lipid-, inflammatory-, and tumor-related genes

The observed reduction in metabolites from pathways associated with de novo FA synthesis and the increased inflammatory profile led us to question if these gene expression alterations were due to direct contact with tumor cells.

(See figure on next page.)

Fig. 4 Biochemical metabolic analysis. **A** Metabolic set enrichment analysis showing altered lipid signatures analyzed by SMPDB metabolite set library. **B, C** Significantly altered lipid metabolite box plots allocated to related pathways. Patients were stratified regarding ISUP group. Statistic comparison was performed between high-risk (groups III, IV, and V) and low-risk (group I). Each box shows the median, quartiles, and extreme values. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

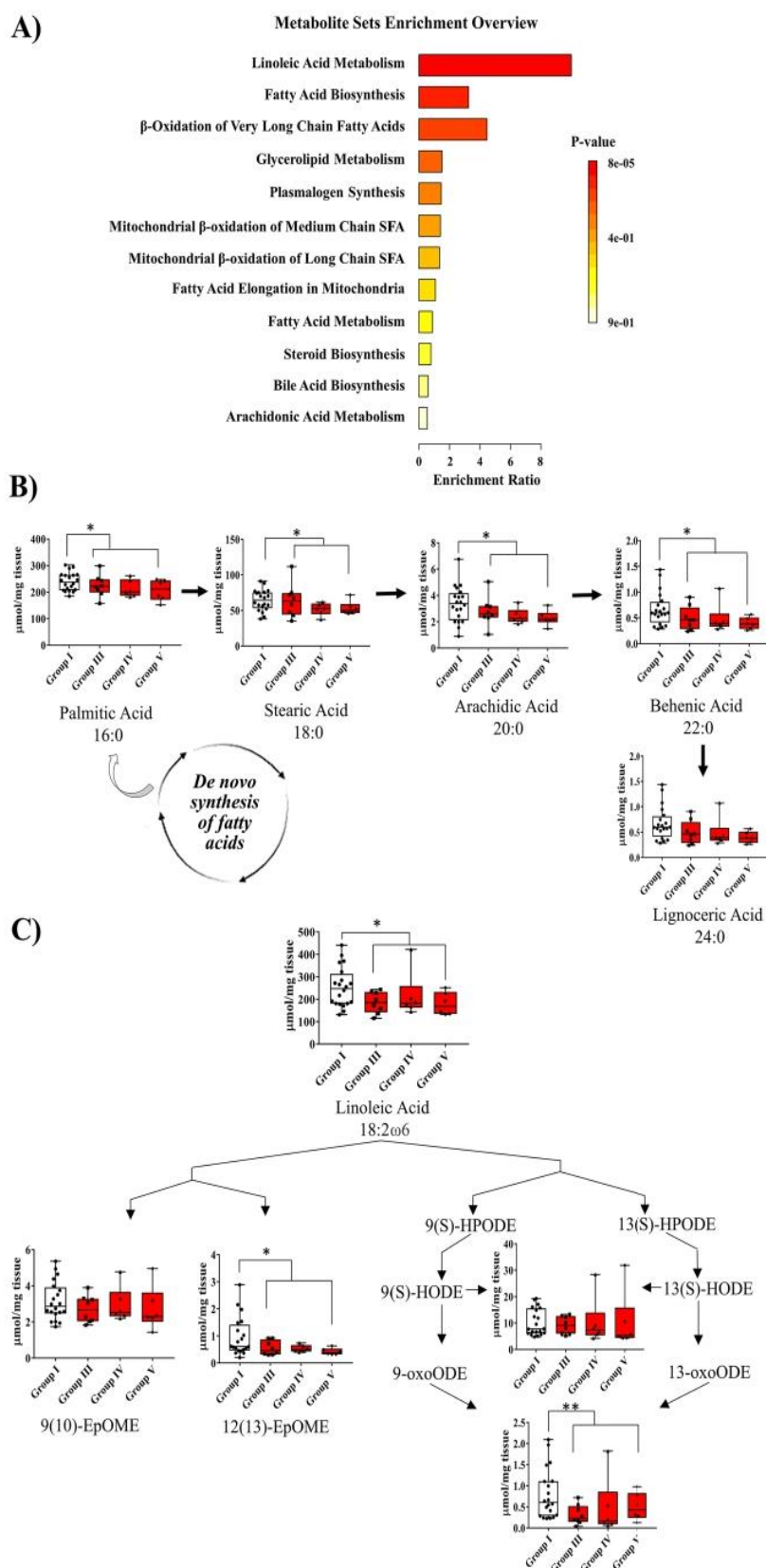
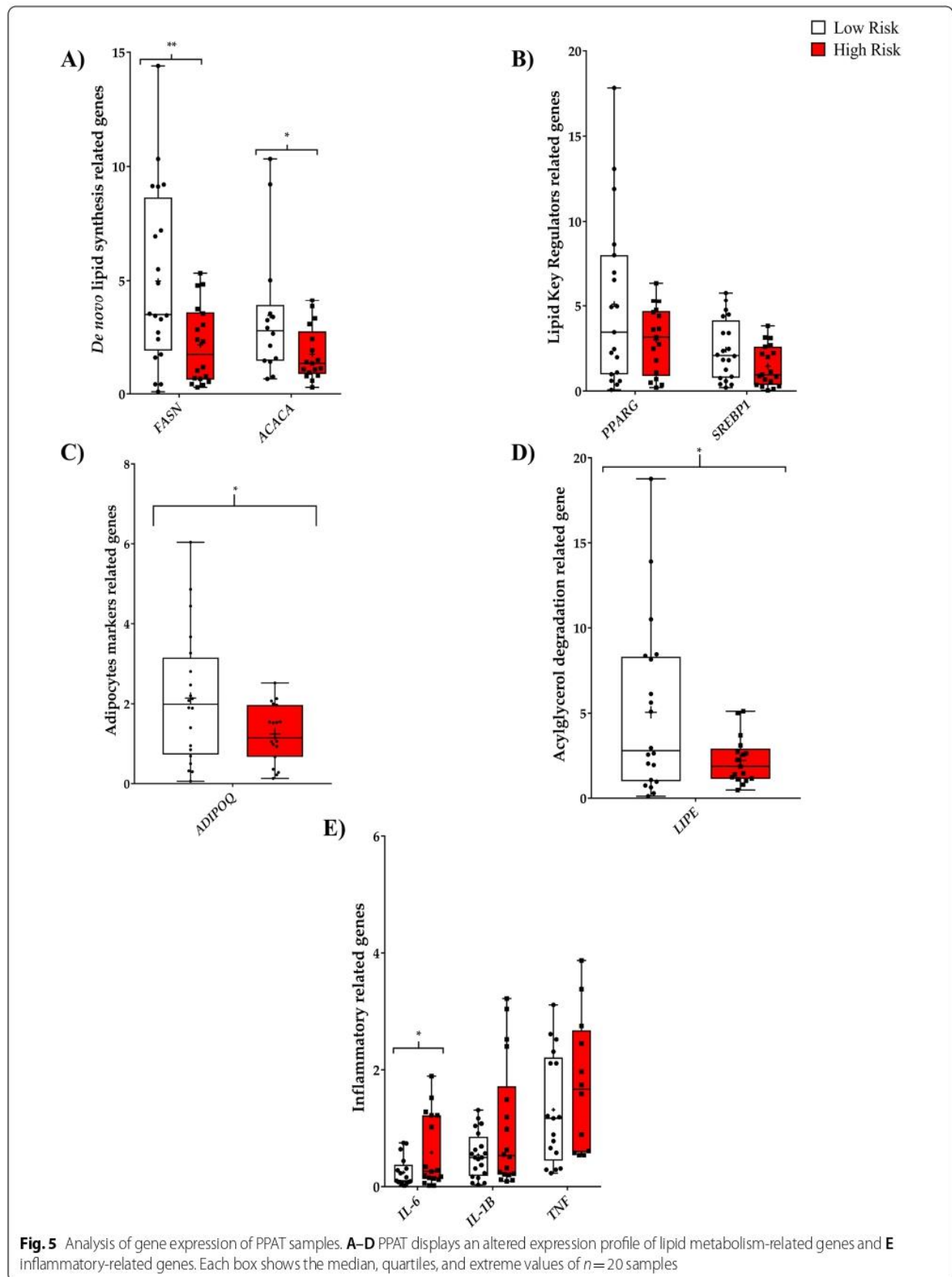


Fig. 4 (See legend on previous page.)



To address this, we co-cultured PPAT explants with 2 different PCa cell lines (PC-3 and LNCaP) and then performed gene expression analysis. Results showed that regardless of the cell line used in the co-culture experiment, the expression of membrane lipid transporter *CD36* and the expression of genes implicated in de novo lipogenesis such as *FASN* and *PPARG*, a transcription factor implicated in lipid metabolism and inflammation, were all significantly downregulated in PPAT explants (Fig. 6A). Of note, the key gene regulator factor *SREBP1* was slightly reduced but did not reach significance (Fig. 6A). The expression of carnitine palmitoyl-transferase 1A (*CPT1A*), responsible for the translocation of FA from the cytosol to the mitochondrial matrix, was also reduced. By contrast, the inflammatory profile in PPAT co-cultured explants was elevated, as shown by an upregulation of cytokines such as *IL-6* and *IL-1B*. Interestingly, fatty acid binding protein 4 (*FABP4*) expression was higher after co-culture, indicating an active cytoplasmic lipid mobilization process between PPAT and PCa cell lines (Fig. 6A). The expression of the lipase *PNPLA2* was reduced in PPAT explants after co-culture, indicating that lipolysis was likely not upregulated under this culturing condition (Fig. 6A). Of note, no differences in co-cultured explants between high-risk and low-risk tumors were observed following co-culture with PCa cell lines in the lipid and inflammatory genes here analyzed (Additional file 6: Fig. S2A-S2B).

Conversely, co-cultured PCa cell lines (both PC-3 and LNCaP) showed a significant increase in the expression of lipid metabolism-related genes such as *CD36*, *FATP5*, *CPT1A*, and *FABP4* and of the inflammation-related genes *IL-6* and *IL-1B* (Fig. 6B, C). Noteworthy, while *FASN*, *SREBP1*, *PPARG*, and *PNPLA2* were upregulated in PC-3 after PPAT explant co-culture (Fig. 6B), no changes were observed in these genes in LNCaP cells after co-culture (Fig. 6C).

Alteration in PCa cell aggressiveness was also observed in both cell lines after PPAT explant co-culture, demonstrated by a significant increase in expression levels of genes implicated in tumor cell proliferation (*ESRRA*) and in tumor invasive and metastatic potential (*MMP-9*, *TWIST1*) (Fig. 6B, C).

An increase in fatty acid uptake is shown in both cell lines (Fig. 6D) after explant co-culture. Also, both PCa

cell lines exhibited enhanced lipid accumulation after explant co-culture (Fig. 6E). Of note, LNCaP co-culture cells showed a significantly higher uptake when compared with co-culture PC-3 cells. No differences in accumulation or in uptake rates were observed in the PCa cell lines studied (PC-3 and LNCaP) regardless of PPAT explant aggressiveness (Additional file 6: Fig. S2C-S2D).

Discussion

The crucial importance of lipids in the malignant phenotype of PCa is clear [2]. The need for lipids by PCa cells can be met by taking up circulating lipids and enhancing de novo FA synthesis [15] or by lipid transfer from stromal adipocytes to PCa cells [16].

Recent studies have shown that FA can fuel prostate tumor growth [6], highlighting the importance of lipids in the progression of PCa. Selective degradation of intracellular lipid droplets by lipophagy as energy source has also been described in PCa by PPAT proximity [17].

In the present study, we found a specific PPAT lipid signature composed of 16 metabolites associated with PCa aggressiveness. Regression analysis showed that from these 16 metabolites, only MG (18:0) and a metabolite involved in the linoleic acid pathway (12–13-EpOME) were independent factors of PCa aggressiveness. However, we are aware that sample size may be one limitation and larger replication studies are needed in order to validate this panel.

The discovery of this signature raises the possibility that PPAT lipid profiling might provide independent information regarding PCa biology. By analyzing total FA composition (SFA, MUFA, and PUFA), we observed a significant increase only in MUFA and a significant decrease in ω -6 PUFA in high-risk PPAT samples. Few studies have investigated this issue in PPAT regarding PCa aggressiveness. While some authors found significantly higher ω -6 levels in PPAT when comparing patients with PCa or benign hyperplasia [7], others failed to observe any association between ω -6 in PPAT and PCa aggressiveness in Caucasians, whereas lower PPAT levels of ω -6 were protective in African-Caribbeans [8]. ω -6 FA are obtained from the diet as they cannot be synthesized in the human body. Thus far, human studies have failed to corroborate whether higher ω -6 levels are related to higher PCa risk or mortality [18]. By contrast, animal and

(See figure on next page.)

Fig. 6 A bidirectional crosstalk occurs between PPAT explants and PCa cell lines. PCa cell lines (PC-3 or LNCaP) were co-cultivated with PPAT explants for 48 h and expression of lipid-, inflammatory-, and tumor-related genes were evaluated by RT-qPCR. **A** Co-cultured explants with LNCaP or PC-3 cells. **B** Co-cultured PC-3 cells. **C** Co-cultured LNCaP cells. **D** Uptake of the fatty acid analog TF2-C12 at 30 and 60 min in PCa cell lines co-cultured with PPAT explants. **E** Lipid accumulation measured with Nile Red dye after 15-min incubation in PCa cell lines co-cultured with PPAT explants. Different lettering over the boxes indicates statistical differences. Significant differences are established at $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$ experiments)

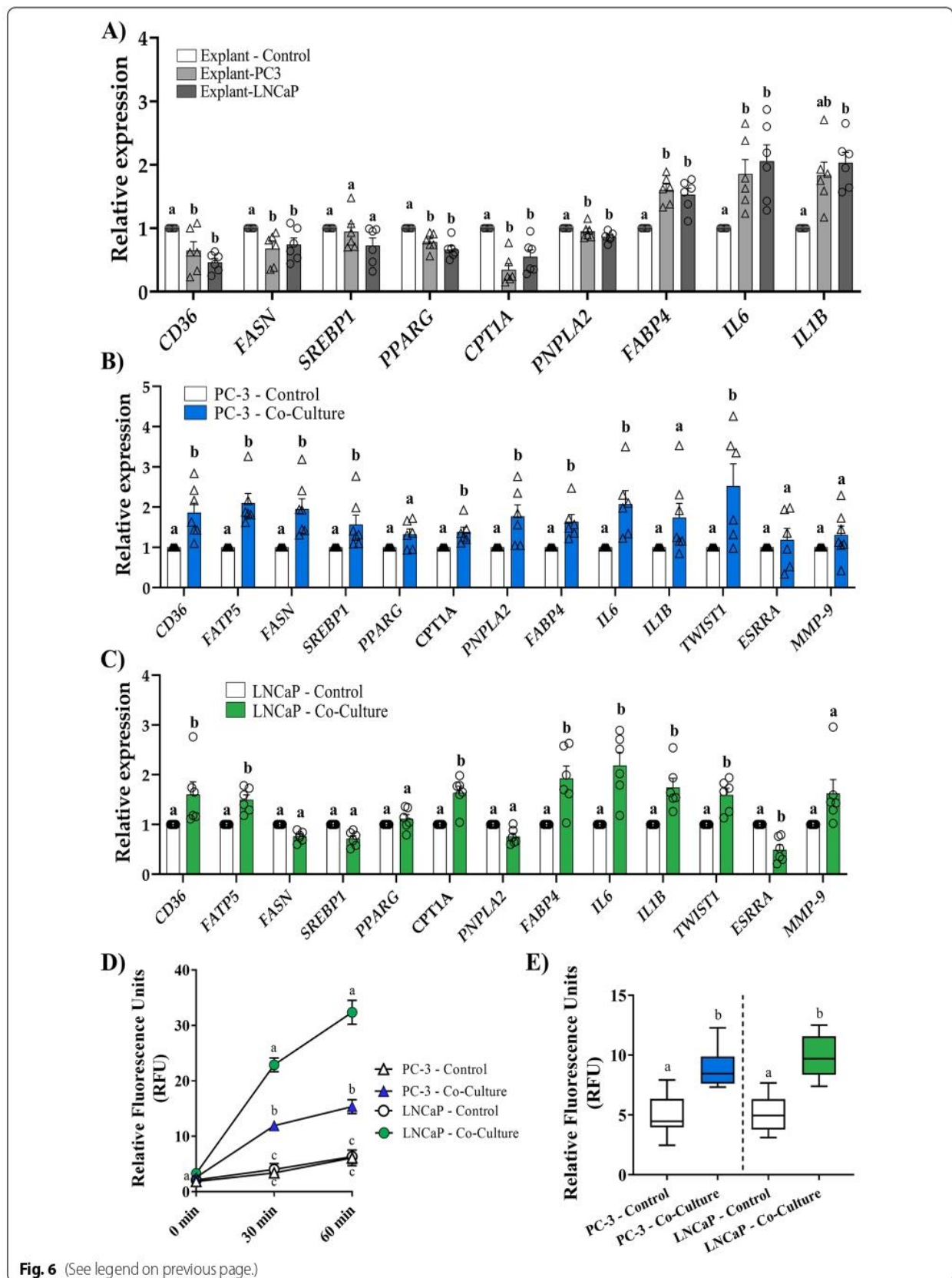
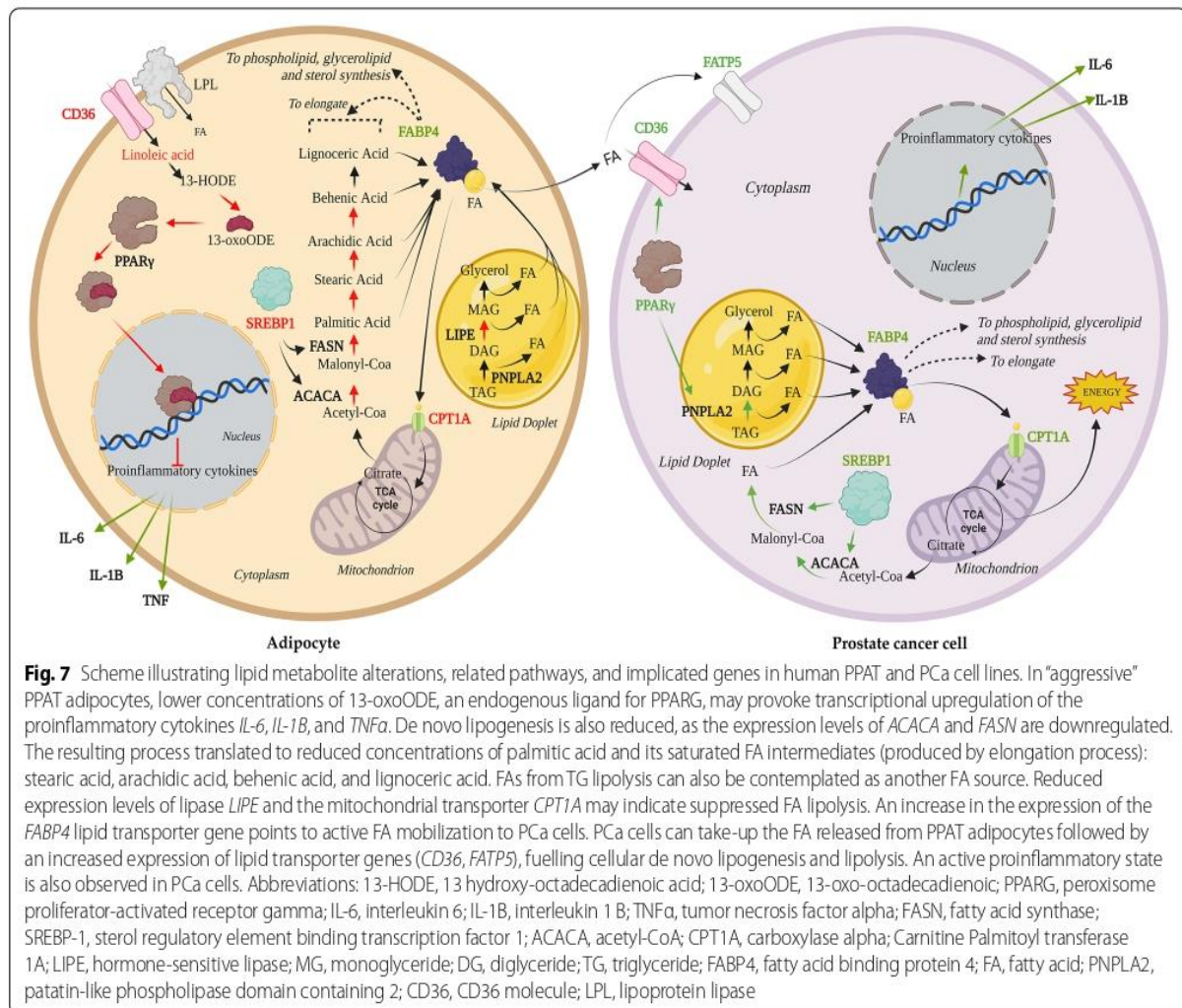


Fig. 6 (See legend on previous page.)



in vitro studies have suggested that ω -6 PUFA stimulate, whereas ω -3 PUFA inhibit, PCa growth [19].

Our lipidomic PPAT analysis revealed significantly higher amounts of total LPI metabolites in samples from high-risk patients. LPI can be generated by the action of phospholipase A on lipids, and it has been established that it might play an important role in several diseases affecting various functions such as cell growth, differentiation, and motility in a number of cell types [20]. For example, the dysregulation of LPI in breast cancer has been related to migration properties [21]. Further investigations will be necessary to understand the role of LPI in PCa.

Mapping of dysregulated FA metabolites onto metabolic pathways revealed a predominant involvement in de novo FA synthesis and linoleic acid metabolism (Fig. 7). Interestingly, all metabolites involved in these pathways were found to be lower in abundance in PPAT samples

from high-risk PCa, clearly indicating a reduced lipid activity in the aggressive PCa-related fat. Interestingly we observed for the first time the reduced expression of genes implicated in de novo FA synthesis, namely *FASN*, *ACACA*, and *SREBP1* in high-risk PPAT (Fig. 7). The reduced expression of lipolytic-related genes such as *LIPE* was also observed in samples from high-risk patients, which was unexpected but nevertheless observed in co-cultured breast cancer cells with adipocytes [4], alluding to a unique adipocyte phenotype in this environment. Upregulation of inflammatory-related genes was also observed in the PPAT of patients with more aggressive PCa, indicating that PPAT is likely not inert.

To strengthen these findings, we performed co-culture experiments using PPAT explants and two PCa cell line models, which revealed ex vivo cross-talk between PPAT and PCa cells, with a dramatic reduction in lipid gene expression in PPAT explants

accompanied by an activated inflammatory state characterized by overexpression of proinflammatory cytokines (Fig. 7). This reinforces the notion that adipocytes can provide lipids to tumor cells and participate in tumor aggressiveness [5]. By contrast, co-cultured PCa cell lines exhibited the opposite behavior with regard to lipid gene expression, which was clearly upregulated in PC-3 cells but did not change in LNCaP cells. Interestingly, the increased expression of fatty acid transporters such as *CD36* and *FATP5* was accompanied by an active uptake and accumulation of lipids in both cell lines when co-cultured with PPAT explants. In this sense, the incorporation of FFAs by PCa cells from neighboring adipocytes and similar uptake of exogenous lipids have been shown to occur in several PCa cell models [5, 22].

Proinflammatory-related genes (*IL-6*, *IL-1B*) were also overexpressed in PCa cell lines. The dysregulated inflammatory profile observed here, in both PCa cell lines and PPAT when in co-culture, especially in the case of *IL-6*, has been shown to play a key role in the acquired pro-invasive effect by tumor cells [4]. We also observed that both PCa cell lines gain aggressive properties when in contact with PPAT explants because expression of genes implicated in proliferation such as estrogen-related receptor alpha (*ESRRA*) [23] and matrix metalloproteinase 9 (*MMP-9*) [24] or involved in migration like twist family BHLH transcription factor 1 (*Twist1*) [25] were clearly upregulated.

Although lipolysis was not evaluated in our ex vivo experiments, other authors showed that PPAT explants basal lipolysis was slightly increased in less aggressive PPAT PCa tissue compared to more aggressive ones, but did not reach significance [9]. Parameters related to PCa aggressiveness such as adipocyte size and stimulated FA release were not altered in their studied explant samples. Of note, when the authors evaluated explant basal FA release rates found a reduced tendency in high-risk PPAT explant samples when compared with the less aggressive counterparts, and only nervonic acid showed differences regarding aggressiveness [9]. In our PPAT analysis, nervonic acid levels were not altered between low- and high-degree PPAT samples, probably because we measured the total PPAT FA profile and not the secreted FA profile.

We also observed interesting changes in linoleic acid metabolism. Linoleic acid can be oxidized to produce 9- and 13-hydroxy-octadecadienoic acid (9- and 13-HODE) and 9- and 13-oxo-octadecadienoic acid (9- and 13-oxoODE). In human colonic epithelial cells, 13-oxoODE has been reported to be an endogenous ligand for PPARG with anti-inflammatory activity [14]. We found reduced concentrations of 13-oxoODE/9-oxoODE in high-risk PPAT samples and reduced

expression levels of *PPARG*, a finding that could explain in part the reduced activity of this transcription factor (Fig. 7). Additionally, *ADIPOQ* gene, which is tightly regulated by *PPARG* [26], was found reduced in the aggressive PPAT samples. Although *PPARG* was initially identified for its role in adipocyte differentiation and in the regulation of genes involved in lipid and glucose metabolism [27], its activation can antagonize nuclear factor-kappa B (NF- κ B) [28]. Thus, reduced expression of *PPARG* can also bolster the increased expression of pro-inflammatory cytokines observed in PPAT samples from aggressive PCa (Fig. 7). The increased expression of pro-inflammatory cytokines (*IL-6*, *TNF α* , *IL-1B*) found here in the aggressive PCa-related PPAT supports the role of PPAT in aggravating the tumor microenvironment, either by direct effects on premalignant cells or by acting on the tumor microenvironment [29].

Linoleic acid can also be converted by cytochrome P450 to epoxy-octadecenoic acids (EpOMEs) in the form of either 9(10)-EpOME (leukotoxin, coronaric acid) or its regioisomer 12(13)-EpOME (isoleukotoxin, vernolic acid). These leukotoxins can be produced by neutrophils, activating their chemotactic activity in disorders such as acute respiratory distress syndrome [30]. We detected lower levels of 12(13)-EpOME in high-risk PPAT; however, the physiological significance of EpOMEs in PCa needs to be further investigated.

To our knowledge, this is the first complete lipidomic profile analysis linked to biological activity regarding aggressiveness in PPAT. Accordingly, we believe that these data provide valuable information for future replication studies in larger cohorts.

Conclusions

Overall, our findings show that the lipid composition of PPAT is altered in patients with high-risk PCa and is associated with changes in the PCa cell lipid metabolism affecting tumor cell processes.

Abbreviations

12,13-EpOME: Vernolic acid; 13OxoODE/9oxoODE: 13-Oxo-9,11-octadecadienoic acid/9-oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid; ACACA: Acetyl-CoA carboxylase alpha; CD36: CD36 molecule; DG: Diglyceride; FA: Fatty acid; FABP4: Fatty acid binding protein 4; FAME: Fatty acid methyl ester; FASN: Fatty acid synthase; IL-1B: Interleukin 1 B; IL-6: Interleukin 6; LC-MS/MS: Liquid chromatography-mass spectrometry; LPC: Lysophosphatidylcholine; LPE: Lysophosphatidylethanolamine; LPI: Lysophosphatidylinositol; LPL: Lipoprotein lipase; MG: Monoglyceride; MUFA: Monounsaturated fatty acid; PC: Phosphatidylcholine (diacylglycerol); PCa: Prostate cancer; PC-O: Phosphatidylcholine (alkyl-acylglycerol); PLS-DA: Partial least squares-discriminant analysis score plot; PPARG: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PPAT: Periprostatic adipose tissue; PUFA: Polyunsaturated fatty acid; SFA: Saturated fatty acid; SM: Sphingomyelin; SREBP-1: Sterol regulatory element binding transcription factor 1; TG: Triglyceride; TNF α : Tumor necrosis factor alpha; VIP: Variable importance in projection.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02457-3>.

Additional file 1: Table S1. Clinical and anthropometrical characteristics of the patients.

Additional file 2. Additional Material and Methods.

Additional file 3: Table S2. Periprostatic adipose tissue lipidomic signatures.

Additional file 4: Table S3. Fatty acids in low-risk and high-risk PPAT.

Additional file 5: Figure S1. A) Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) model to evaluate the potential of the 70 significant lipids to discriminate between low- and high-risk PPAT in 2-dimensions and 3-dimensions. **B)** Variable importance in projection (VIP) showing the important metabolites that are discriminatory between low-risk PPAT and high-risk PPAT.

Additional file 6: Figure S2. A) Gene expression analysis of PPAT explants segregated according to aggressiveness after being co-cultured with PC-3 cells **B)** Gene expression analysis of PPAT explants segregated according to aggressiveness after being co-cultured with LNCaP cells **C)** Graph representing lipid uptake according to cell line and type of PPAT **D)** Graph representing lipid accumulation according to cell line and type of PPAT.

Acknowledgements

We wish to 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 & PT13/0010/0062) for its collaboration. We thank Antonio del Pino and Pol Gil Herrero and Salvador Fernández Arroyo from the Metabolomics facility of the Center for Omic Sciences (COS) Joint Unit of the *Universitat Rovira i Virgili-Eurecat*, for their contribution to mass spectrometry analysis.

Authors' contributions

All authors read and approved the final manuscript. Conceptualization: M.R.CH, A.A.-C., and S.S.-M. Adipose tissue collection: S.S.-M. Clinical pathological patient information: X.R.-P., H.E.-T., M.A.-S., J.S.-T., X.B.-E., and M.P.-S. Formal analysis: M.R.CH, A.A.-C., and S.S.-M. Writing, review, and editing: M.R.CH, X.R.-P., J.S.-T., S.S.-M., and A.A.-C. Funding acquisition: M.R.CH and X.R.-P. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

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

Availability of data and materials

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

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; Ref. CEIM205/2020). All participants provided written consent before starting the study.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Disease Biomarkers and Molecular Mechanisms Group, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Joan XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, C/ Dr. Mallafre Guasch, 4. 43007, Tarragona, Spain. ²Urology Unit, Joan XXIII University Hospital, Tarragona, Spain. ³Pathology Unit, Joan XXIII University Hospital, Tarragona, Spain.

Received: 3 February 2022 Accepted: 30 June 2022

Published online: 18 August 2022

References

- Estève D, Roumigué M, Manceau C, Milhas D, Muller C. Periprostatic adipose tissue: a heavy player in prostate cancer progression. *Curr Opin Endocr Metab Res.* 2020;10:29–35. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2020.02.007>.
- Zadra G, Photopoulos C, Loda M. The fat side of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831:1518–32.
- Galbraith L, Leung HY, Ahmad I. Lipid pathway deregulation in advanced prostate cancer. *Pharmacol Res.* 2018;131:177–84.
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 2011;71:2455–65.
- Laurent V, Toulet A, Attané C, Milhas D, Dauvillier S, Zaidi F, et al. Periprostatic adipose tissue favors prostate cancer cell invasion in an obesity-dependent manner: role of oxidative stress. *Mol Cancer Res.* 2019;17:821–35.
- 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;11:1–14.
- Careaga VP, Sacca PA, Mazza ON, Scorticati C, Vitagliano G, Fletcher SJ, et al. Fatty acid composition of human periprostatic adipose tissue from Argentine patients and its relationship to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Res Cancer Tumor.* 2015;4:1–6. <https://doi.org/10.5923/jrct.2015040101>.
- Figiel S, Pinault M, Domingo I, Guimaraes C, Guibon R, Besson P, et al. Fatty acid profile in peri-prostatic adipose tissue and prostate cancer aggressiveness in African-Caribbean and Caucasian patients. *Eur J Cancer.* 2018;91:107–15.
- Miladinovic D, Cusick T, Mahon KL, Haynes AM, Cortie CH, Meyer BJ, et al. Assessment of periprostatic and subcutaneous adipose tissue lipolysis and adipocyte size from men with localized prostate cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(6):1385.
- Allott EH, Arab L, Su LJ, Farnan L, Fontham ETH, Mohler JL, et al. Saturated fat intake and prostate cancer aggressiveness: results from the population-based North Carolina-Louisiana Prostate Cancer Project. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017;20:48–54.
- 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. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(2):244–52.
- Kang H. Sample size determination and power analysis using the G*Power software. *J Educ Eval Health Prof.* 2021;18:1–12.
- Westerhuis JA, van Velzen EJJ, Hoefsloot HJ, Smilde AK. Discriminant Q2 (DQ2) for improved discrimination in PLS-DA models. *Metabolomics.* 2008;4:293–6.
- Altmann R, Hausmann M, Spöttl T, Gruber M, Bull AW, Menzel K, et al. 13-Oxo-ODE is an endogenous ligand for PPAR γ in human colonic epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2007;74:612–22.
- Wu X, Daniels G, Lee P, Monaco ME. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2(2):111–20.
- 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;48:1846–56.
- Fontaine A, Bellanger D, Guibon R, Bruyère F, Brisson L, Fromont G. Lipophagy and prostate cancer: association with disease aggressiveness and proximity to periprostatic adipose tissue. *J Pathol.* 2021;255:166–76.
- Hanson S, Thorpe G, Winstanley L, Abdelhamid AS, Hooper L, Abdelhamid A, et al. Omega-3, omega-6 and total dietary polyunsaturated fat on

- cancer incidence: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Br J Cancer*. 2020;122:1260–70.
19. Meng H, Shen Y, Shen J, Zhou F, Shen S, Das UN. Effect of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cancer (PC-3) and prostate epithelial (RWPE-1) cells in vitro. *Lipids Health Dis*. 2013;12:1. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-160>.
 20. Arifin SA, Falasca M. Lysophosphatidylinositol signalling and metabolic diseases. *Metabolites*. 2016;6:1–11.
 21. Zhou XL, Guo X, Song YP, Zhu CY, Zou W. The LPI/GPR55 axis enhances human breast cancer cell migration via HBXIP and p-MLC signaling. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39:459–71. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.157>.
 22. Louie SM, Roberts LS, Mulvihill MM, Luo KND. Cancer cells incorporate and remodel exogenous palmitate into structural and oncogenic signaling lipids. *Biochim Biophys Acta*. 2013;183:1566–72. <https://doi.org/10.1038/nrm3313>. MicroRNAs.
 23. Valcarcel-Jimenez L, Macchia A, Crosas-Molist E, Schaub-Clerigüe A, Camacho L, Martín-Martín N, et al. PGC1 α suppresses prostate cancer cell invasion through ERR α transcriptional control. *Cancer Res*. 2019;79:6153–65.
 24. Oguić R, Mozetić V, CiniTešar E, FućkarČupić D, Mustać E, Orević G. Matrix metalloproteinases 2 and 9 immunoexpression in prostate carcinoma at the positive margin of radical prostatectomy specimens. *Patholog Res Int*. 2014;2014: 262195. <https://doi.org/10.1155/2014/262195>.
 25. Eide T, Ramberg H, Glackin C, Tindall D, Taskén KA. TWIST1, a novel androgen-regulated gene, is a target for NKX3-1 in prostate cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2013;13:2–7.
 26. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 2003;52:1655–63. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1655>.
 27. Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue - understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:386–95.
 28. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771:926–35.
 29. Landskron G, De La Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014: 149185. <https://doi.org/10.1155/2014/149185>.
 30. Thompson DA, Hammock BD. Dihydroxyoctadecamonoenoate esters inhibit the neutrophil respiratory burst. *J Biosci*. 2007;32:279–91.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Additional File 1

	ISUP GG Classification		<i>p</i> -value
	Low Risk	High Risk	
	Group I (n=20)	Group III (n=8)	
	Group II (n=0)	Group IV (n=6)	
	Total (n=20)	Group V (n=6)	
		Total (n=20)	
	Median (IQR)	Median (IQR)	
<i>Anthropometric parameters</i>			
Age (years)	67.29 (61.25, 70.87)	66.31 (63.00, 72.23)	0.491
BMI (kg/m ²)	26.54 (24.09, 28.80)	25.47 (23.96, 28.51)	0.931
Prostatic volume (cc)	54.80 (34.00, 84.25)	42.1 (30.40, 52.75)	0.165
<i>Glycaemic profile</i>			
Glucose (mmol/L)	5.44 (4.79, 6.44)	5.33 (4.44, 5.81)	0.274
Insulin (pmol/L)	66.53 (51.92, 106.71)	73.38 (59.21, 107.94)	0.526
HOMA-IR	2.37 (1.64, 4.28)	2.68 (1.97, 3.85)	0.925
HbA1c (%)	5.50 (5.40, 6.30)	5.40 (5.30, 5.78)	0.183
<i>Lipid profile</i>			
Cholesterol (mmol/L)	4.82 (4.19, 5.55)	4.80 (4.21, 5.59)	0.841
HDL cholesterol (mmol/L)	1.32 (1.14, 1.66)	1.48 (1.11, 1.67)	0.849
LDL cholesterol (mmol/L)	2.88 (2.24, 3.45)	2.75 (2.40, 3.24)	0.945
Triglycerides (mmol/L)	1.29 (0.92, 2.21)	1.30 (0.90, 1.79)	0.937
<i>Hepatic profile</i>			
AST (µkat/L)	0.35 (0.27, 0.40)	0.35 (0.32, 0.40)	0.602
ALT (µkat/L)	0.33 (0.24, 0.48)	0.34 (0.28, 0.42)	0.395
GGT (µkat/L)	0.40 (0.30, 0.72)	0.38 (0.29, 0.55)	0.281
<i>Renal profile</i>			
Uric acid (µmol/L)	370 (280, 445)	360 (310, 405)	0.428
Urea (mmol/L)	13.21 (10.89, 17.40)	14.99 (11.87, 18.83)	0.337
Creatinine (µmol/L)	79.56 (72.26, 94.37)	84.42 (73.81, 100.97)	0.830
<i>Hormonal profile</i>			
SHBG (nmol/L)	41.50 (38.10, 54.35)	39.05 (29.23, 44.76)	0.204
Testosterone (nmol/L)	15.54 (12.36, 20.00)	13.37 (10.23, 16.91)	0.129
<i>Tumoral markers</i>			
Total PSA (µg/L)	5.59 (4.57, 7.08)	7.41 (5.04, 14.61)	0.010

Additional Table S1. Clinical and anthropometrical characteristics of patient's studied samples.

Abbreviations: **IQR:** Interquartile Range **ISUP (GG):** International Society of Urological Pathology Gleason Grading **BMI,** Body mass index; **cc,** centilitre; **HOMA-IR,** Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; **HDL,** High-density lipoprotein; **LDL,** Low-density lipoprotein; **GGT,** Gamma Glutamyl transferase; **PSA,** Prostate specific antigen.

Additional File 2

Additional Material and Methods

FAME ANALYSIS

To obtain volatile fatty acids methyl ester derivatives (FAMES), 10 mg of peri-prostatic adipose tissue samples were mixed with IS solution, chloroform and methanolic HCl and incubated at 80 °C for 2 h. Afterwards, obtained FAMES were extracted by a liquid-liquid extraction using hexane before to be injected on GC-MS system

FAME analysis by GC-MS was performed using an Agilent GC 7890A Series coupled to an Agilent QQQ 7000 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Chromatographic separation was performed using a HP-88 (100 m x 250 µm x 0.25 µm) (Agilent). A volume of 1 µL of sample was automatically injected into a split/splitless inlet at a split rate of 20:1 and at a temperature of 240 °C. Helium (99.999% purity) was used as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. To separate FAMES an oven program between 140 and 240 °C was applied. Ionisation was performed by electron impact (EI), with an electron energy of 70 eV and a source temperature of 250 °C.

LIPIDOMICS (METHANOLIC EXTRACTION) ANALYSIS

Extraction of lipidic methanolic fraction and was performed by adding 250 µL of methanol containing internal standards (Myristic acid-d27, Arachidonic acid-d8, Cholic acid-d4, taurocholic acid-d4, Lysophosphatidylcholine 18:1-d7 and Cortisol-d4) into a tube with approximately 20 mg of peri-prostatic adipose tissue. Then, the samples were homogenized on a Bullet Blender Homogenizer using Stainless-steel beads and incubated at -20°C for 30 min., centrifuged at 15,000 rpm and supernatant was evaporated to dryness and reconstituted with 100 µL of methanol.

The separation of lipid species was performed by injection of 5 µl of samples into an UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) equipped with an ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm) (Waters Corporation, Mildford, MA, USA) thermostated at 40 °C. The elution was performed using water (A) and acetonitrile (B), containing both 0.05% formic acid, as mobile phases at a flow rate of 0.3 mL/min and using the following gradient program: 2 min, 50% B; 10 min, 98% B; 14.5 min, 98% B; and 15 min, 50% B. For the detection of lipids, the chromatograph was coupled to a qTOF 6550 series (Agilent Technologies) by an electrospray ionization source (ESI) operating in negative mode and the following parameters: gas temperature: 225 °C; gas flow: 11 L/min; Nebulizer: 35 psi; sheath gas temperature: 300 °C; sheath gas flow: 12 L/min; Capillary voltage: 3500 V; nozzle voltage: 500 V. The identification of lipid species was performed by matching their accurate mass and tandem mass spectrum, when available, to Metlin-PCDL from Agilent containing more than 40,000 metabolites and lipids. In addition, chromatographic behaviour of pure standards for each family and bibliographic information was used to ensure their putative identification.

ACYLCARNITINES ANALYSIS

The extraction of acylcarnitines was performed using the same procedure than in the lipidomics (methanolic extraction) analysis. In this case, methanol contains a mix of internal standard for acylcarnitines (C0-D9, C2:0-D3, C3:0-D3, C4:0-D3, C5:0-D9, C8:0-D3, C14:0-D9 and C16:0-D9).

Acylcarnitines were analyzed using an UHPLC 1290 Infinity II coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (QqQ-MS) by an ESI interface (Agilent Technologies). Chromatographic separation was performed using a Kinetex Polar C18 column (2.6 μ m, 2.1 mm X 100 mm) (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) by injecting 1 μ L of sample. Mobile phases consist of water (A) and methanol (B), both with 0.1% formic acid at a flow rate of 0.4 mL/min and a gradient program as follow: 0 min, 0% B; 1 min, 0% B; 11 min, 100% B; 13 min, 100% B, 13.1 min, 0% B; 15 min, 0% B.

ESI interface and triple quadrupole mass spectrometer, working on positive mode and multiple reaction monitoring (MRM) mode, have set the following parameters: gas temperature: 200 °C; gas flow: 6 L/min; Nebulizer: 30 psi; sheath gas temperature: 375 °C; sheath gas flow: 11 L/min; Capillary voltage: 3500 V.

LIPIDOMICS (FOLCH EXTRACTION) ANALYSIS

A liquid-liquid extraction based on Folch procedure was performed by adding 750 μ L of chloroform:methanol (2:1) containing internal standard (Lipidomic SPLASH®: lysophosphatidylcholine 18:1-d7, phosphatidylcholine 33:1-d7, sphingomyelin 36:2-d9, diacylglyceride 33:1-d7, triacylglyceride 48:1-d7 and cholesteroyl ester 18:1-d7) to approximately 10 mg of peri-prostatic adipose tissue. Then, the samples were homogenized on a Bullet Blender Homogenizer using Stainless-steel beads and incubated at -20°C for 30 min. Afterwards, 240 μ L of water with NaCl (0.8 %, w,v) was added and mixture was centrifuged at 15,000 rpm. Lower phase was recovered, evaporated to dryness, reconstituted with 400 μ L of methanol:methyl-tert-butyl ether (9:1) and placed into chromatographic vials for their analysis.

Chromatographic separation was performed by injection of 2 μ L of sample into an UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies) equipped with a KINETEX EVO C18 column (2.6 μ m, 2.1 mm X 100 mm) (Phenomenex Inc.) thermostated at 60 °C. Elution program was consists in a ternary mobile phase containing water (A), methanol (B) and 2-propanol (C) with 10mM ammonium formate and 0.1% formic acid at a flow rate of 0.6 mL/min and a gradient as follow: 0 min, 10% B and 35% C; 0.5 min, 10 % B and 45% C; 1.5 min, 9.5% B and 47.7% C; 1.6 min, 7.5% B and 58.5% C; 5 min, 7% B and 61.2% C; 5.1 min, 4% B and 77.4% C; 7.5 min, 3.5% B and 80.1% C; 9 min, 3.5% B and 80.1% C; 9.5 min, 100% C; 11.5 min, 100% C; 11.6 min, 10% B and 45% C; 13min, 10% B and 45% C. For the detection of lipid species, chromatograph was coupled to a qTOF 6550 series (Agilent Technologies) by an electrospray ionization source (ESI) operating in positive mode and setting the following parameters: gas temperature: 225 °C; gas flow: 11 L/min; Nebulizer: 35 psi; sheath gas temperature:

300 °C; sheath gas flow: 12 L/min; Capillary voltage: 3500 V; nozzle voltage: 500 V. The identification of lipid species was performed by matching their accurate mass and tandem mass spectrum, when available, to Metlin-PCDL from Agilent containing more than 40,000 metabolites and lipids. In addition, chromatographic behaviour of pure standards for each family and bibliographic information was used to ensure their putative identification. The identification indicates the lipid family (PC-phosphatidylcholine, SM-sphingomyelin, DG-diacylglycerol, TG-triacylglycerol and MG-monoacylglycerol), the total number of carbons of the acyl chains and the number of double bonds.

Additional File 3

Lipid species	Names	Low Risk (n= 20) Median ± [range]	High Risk (n= 20) Median ± [range]
Fatty acids (FAME)			
FA(14:0) (µmol/mg)	Myristic Acid	38.64 [32.77; 49.92]	31.36 [27.72; 41.37]
FA(16:0) (µmol/mg)	Palmitic Acid	238.52 [207.70; 265.10]	215.38 [187.26; 243.61]
FA(18:0) (µmol/mg)	Stearic Acid	64.34 [53.23; 75.35]	53.02 [47.04; 66.19]
FA(20:0) (µmol/mg)	Arachidic Acid	3.38 [2.12; 4.18]	2.36 [2.14; 3.04]
FA(22:0) (µmol/mg)	Behenic Acid	0.60 [0.41; 0.81]	0.40 [0.31; 0.51]
FA(23:0) (µmol/mg)	Tricosanoic Acid	0.04 [0.03; 0.06]	0.03 [0.02; 0.04]
FA(24:0) (µmol/mg)	Lignoceric Acid	0.26 [0.16; 0.42]	0.19 [0.14; 0.23]
FA(18:2n-6)	Linoleic Acid	247.25[180.58;312.61]	182.29 [144.40; 228.12]
LIP-I (more hydrophobic lipids)			
FA(12:0)	Lauric Acid	1.30 [1.16; 1.64]	1.19 [0.99; 1.32]
FA(14:0)	Myristic Acid	3.98 [3.23; 5.16]	3.15 [2.75; 4.75]
FA(15:0)	Pentadecanoic Acid	1.07 [0.88; 1.26]	0.86 [0.69; 1.15]
FA(18:0)	Stearic Acid	37.91 [31.87; 45.45]	33.13 [24.33; 42.07]
12,13-EpOME	Vernolic Acid	0.61 [0.46; 1.41]	0.44 [0.34; 0.63]
9,12,13-TriHOME	Pinellic acid	2.80 [2.31; 3.27]	3.31 [2.48; 3.83]
FA(18:2n-6 (iso-2))	Linoleic Acid iso-2	1.19 [0.95; 2.08]	0.96 [0.60; 1.32]
FA(18:2n-6 (iso-1))	Linoleic Acid	39.43 [32.05; 59.94]	31.57 [24.98; 47.68]
FA(21:2n-7)	11,13-Eicosadienoic Acid	3.69 [2.59; 4.17]	2.70 [1.59; 3.48]
15,16-EpODE	15,16-epoxy-13-OH-9Z,11E-octadecadienoic acid	0.75 [0.63; 0.96]	0.60 [0.53; 0.83]
13-oxoODE/9-oxoODE	13-Oxo-9,11-octadecadienoic acid/9-oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid	0.60 [0.29; 1.11]	0.27 [0.13; 0.55]
LPI(18:2)	1-(9Z,12Z-octadecadienyl)-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)	0.25 [0.16; 0.41]	0.36 [0.27; 0.51]
LPI(16:0)	1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)	0.52 [0.42; 0.81]	0.84 [0.60; 1.10]
LPI(18:1)	1-(9Z-octadecenyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)	2.08 [1.11; 3.52]	2.97 [1.93; 4.83]
LPI(18:0)	1-octadecanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)	7.12 [5.25; 10.17]	9.51 [6.04; 14.02]
LPE(20:5)sn2	2-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	0.18 [0.15; 0.25]	0.31 [0.24; 0.48]
LPE(20:5)sn1	1-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenyl)-glycero-3-	0.05 [0.03; 0.08]	0.09 [0.06; 0.13]

	phosphoethanolamine		
LPE(22:6)sn2	2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	0.51 [0.41; 0.73]	0.69 [0.50; 1.05]
LPE(18:2)sn2	2-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	10.39 [8.34; 12.60]	7.94 [6.16; 10.33]
LPE(20:4)sn2	2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine/2-(8Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	6.57 [5.45; 8.06]	8.35 [6.86; 10.40]
LPE(20:2)sn1	1-(11Z,14Z-eicosadienoyl)-glycero-3-phosphoethanolamine	0.10 [0.07; 0.11]	0.07 [0.06; 0.09]
LPC(14:2)sn2	2-tetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	0.02 [0.02; 0.03]	0.03 [0.02; 0.04]
LPC(20:5)sn2	2-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosapentaenoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine	0.02 [0.01; 0.03]	0.03 [0.02; 0.04]
LPC(16:1)sn2	2-(9Z-hexadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine /2-(9E-hexadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	0.08 [0.05; 0.10]	0.12 [0.08; 0.15]
LPC(22:6)sn2	2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	0.02 [0.01; 0.03]	0.04 [0.02; 0.06]
LPC(20:4)sn2	2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	0.32 [0.24; 0.44]	0.52 [0.33; 0.71]
LPC(17:1)sn2	1-(10Z-heptadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	0.004 [0.001; 0.008]	0.01 [0.003; 0.014]
LPC(20:3)sn2	1-(5Z,8Z,11Z-eicosatrienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	0.07 [0.06; 0.10]	0.10 [0.08; 0.14]
LIP-II (less hydrophobic lipids)			
MG(18:0)		67.56 [54.22; 104.91]	48.27 [42.88; 61.48]
DG(34:0)		16.07 [14.01; 20.84]	16.87 [14.3; 18.71]
TG(48:4)		33.97 [19.44; 45.07]	25.68 [18.64; 27.98]
TG(50:4)		313.38 [199.07; 395.65]	230.41 [185.47; 263.82]
TG(52:5)		524.37 [340.23; 643.99]	340.26 [292.80; 403.39]
TG(51:4)		38.49 [32.20; 57.51]	32.56 [24.03; 36.19]
TG(54:6)		773.70 [436.19; 1320.21]	389.25 [285.82; 586.69]
TG(53:5)		31.15 [23.53; 36.74]	22.93 [18.27; 27.94]
TG(52:4)		7513.8 [4966.69; 8971.21]	4940.05 [4089.82; 5815.22]
TG(51:3)		255.97 [245.70; 356.63]	216.98 [183.35; 271.24]
TG(54:5)		7235.8 [4216.47; 9657.85]	4349.93 [3405.53; 5566.82]

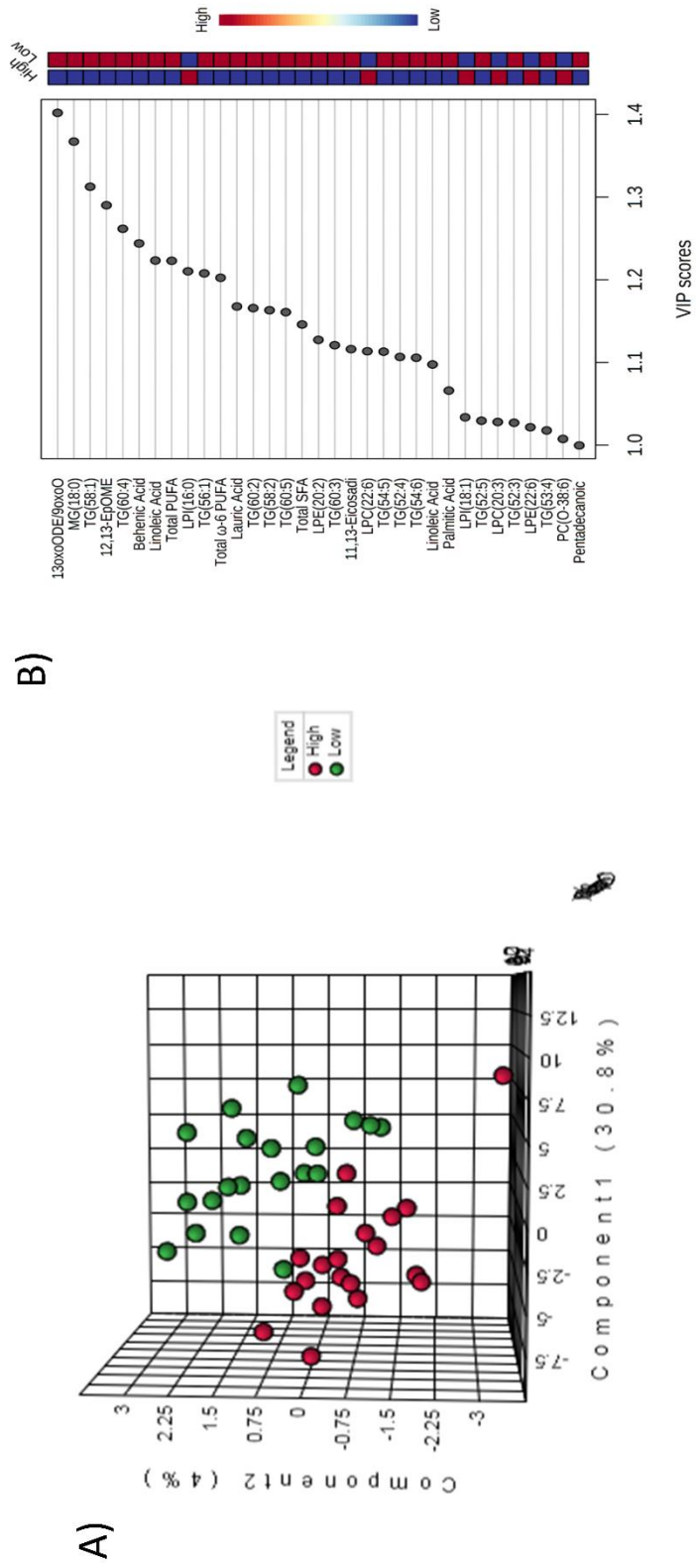
TG(53:4)		181.51 [149.13; 253.33]	157.29 [128.31; 172.50]
TG(52:3)		25251.2 [22296.2; 28698]	22346.2 [20511.67; 24516.2]
TG(55:4)		68.29 [55.86; 74.15]	56.13 [46.18; 69.40]
TG(52:0)		20.31 [15.12; 25.58]	16.77 [12.21; 19.78]
TG(54:1)		267.32 [144.27; 333.93]	190.62 [145.93; 232.44]
TG(60:5)		5.78 [4.16; 6.99]	4.43 [2.30; 5.97]
TG(58:3)		63.12 [49.75; 79.89]	47.31 [33.58; 71.95]
TG(55:1)		7.16 [4.59; 9.65]	5.47 [4.10; 6.61]
TG(60:4)		13.76 [9.58; 17.62]	9.30 [7.12; 11.37]
TG(56:1)		39.56 [35.51; 51.51]	27.50 [17.35; 34.78]
TG(58:2)		59.51 [44.43; 72.08]	38.46 [23.56; 51.60]
TG(60:3)		32.78 [22.18; 42.91]	22.16 [14.67; 25.54]
TG(58:1)		30.27 [23.24; 35.60]	18.35 [11.68; 26.14]
TG(60:2)		36.16 [23.92; 45.44]	22.31 [14.16; 30.01]
SM(18:1;2/20:0)		1.19 [0.90; 1.52]	1.22 [0.97; 1.39]
PC(32:0)		0.54 [0.43; 0.72]	0.64 [0.56; 0.79]
PC-O(36:5)		0.11 [0.09; 0.17]	0.19 [0.15; 0.28]
PC-O(36:4)		0.21 [0.19; 0.29]	0.27 [0.22; 0.32]
PC-O(38:6)		0.03 [0.02; 0.04]	0.06 [0.05; 0.08]
Acylcarnitines			
C3DC	Malonyl carnitine	1.14 [0.89; 1.48]	1.29 [1.06; 1.54]

Additional Table S2. Periprostatic adipose tissue lipidomic signatures. Significant signatures after comparing Low PCa PATT vs High PCa PATT. Abbreviations: FA: Fatty acid; LPI: lysophosphatidylinositol; LPE: lysophosphatidylethanolamine; LPC: lysophosphatidylcholine; MG: monoglyceride; DG: diglyceride; TG: triglyceride; PC: phosphatidylcholine (diacylglycerol); PC-O: phosphatidylcholine (alkyl-acyl-glycerol); SM: sphingomyelin.

Additional File 4
Table S3. FA in low risk and High risk PPAI

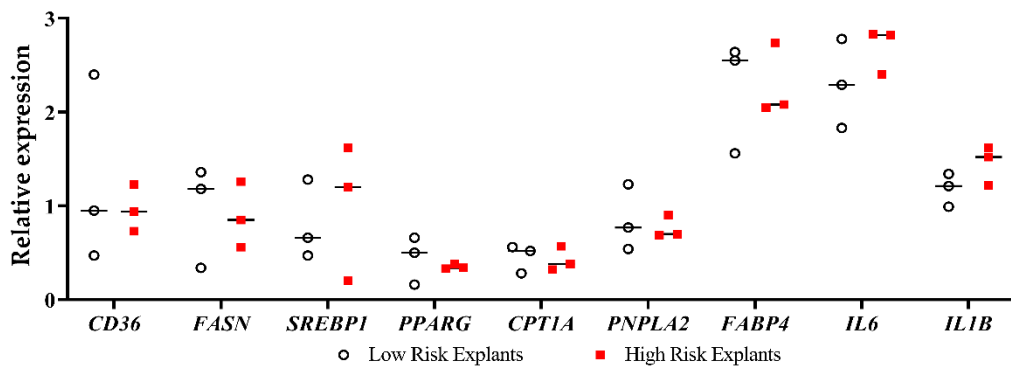
Fatty Acids (FA)	Low Risk		High Risk	
	Median (Range)	% over Total [Median (Range)]	Median (Range)	% over Total [Median (Range)]
Saturated Fatty Acids (SFA)				
Dodecanoic acid (C12:0)	355.69 (314.26, 422.93)	28.53 (26.24, 31.22)	320.46 (273.91, 366.72)	27.59 (26.55, 30.11)
Myristic acid (C14:0)	12.99 (5.52, 17.42)		9.23 (4.55, 15.08)	
Pentadecanoic acid (C15:0)	38.64 (32.77, 49.91)		31.36 (27.71, 41.37)	
Palmitic acid (C16:0)	3.72 (3.12, 4.64)		3.46 (2.64, 4.39)	
Heptadecanoic acid (C17:0)	238.52 (207.69, 265.10)		215.38 (187.26, 243.61)	
Stearic acid (C18:0)	3.67 (3.24, 4.58)		3.42 (3.06, 3.93)	
Arachidic acid (C20:0)	64.34 (53.23, 75.35)		53.02 (47.04, 66.19)	
Behenic acid (C22:0)	3.38 (2.11, 4.18)		2.35 (2.14, 3.04)	
Tricosanoic acid (C23:0)	0.59 (0.41, 0.81)		0.39 (0.31, 0.51)	
Lignoceric acid (C24:0)	0.04 (0.03, 0.06)		0.03 (0.02, 0.04)	
	0.26 (0.16, 0.42)		0.19 (0.14, 0.23)	
Monounsaturated Fatty Acid (MUFA)				
Myristoleic acid (C14:1 [cis-9])	663.69 (545.41, 686.03)	49.99 (48.23, 52.33)	622.13 (552.44, 675.15)	54.68 (50.11, 56.59)
Palmitoleic acid (C16:1 [cis-9])	2.89 (2.25, 3.81)		2.60 (2.04, 3.24)	
Oleic acid (C18:1 [cis-9])	35.40 (26.81, 51.83)		34.27 (28.48, 47.20)	
Erucic acid (C22:1 [cis-13])	620.48 (505.07, 651.01)		578.08 (524.79, 627.38)	
Nervonic acid (C24:1 [cis-15])	0.38 (0.31, 0.52)		0.36 (0.25, 0.52)	
	0.22 (0.19, 0.29)		0.20 (0.14, 0.30)	
Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA)				
Linolenic acid (C18:3 [cis-9,12,15])	9.62 (8.33, 12.61)	0.79 (0.64, 1.06)	9.98 (8.29, 11.82)	0.82 (0.73, 1.09)
Eicosapentanoic acid (C20:5 [cis-5,8,11,14,17])	7.21 (5.80, 8.02)		6.32 (5.19, 8.35)	
Docosahexanoic acid (C22:6 [cis-4,7,10,13,16,19])	0.55 (0.38, 0.79)		0.67 (0.42, 1.00)	
	2.20 (1.95, 3.03)		2.66 (1.97, 3.69)	
Omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA)				
Linoleic acid (C18:2 [cis-9,12])	262.78 (190.63, 326.64)	18.98 (16.31, 22.78)	194.83 (153.97, 239.66)	17.05 (13.76, 18.52)
Linolenic acid (C18:3 [cis-6,9,12])	247.25 (180.58, 312.61)		182.29 (144.40, 228.12)	
Eicosadienoic acid (C20:2 [cis-11,14])	1.17 (0.74, 1.46)		0.86 (0.71, 1.25)	
Arachidonic acid (C20:4 [cis-5,8,11,14])	4.43 (3.73, 5.55)		3.85 (3.18, 4.26)	
	6.22 (5.49, 8.56)		6.62 (5.87, 8.92)	

Additional File 5: Figure S1

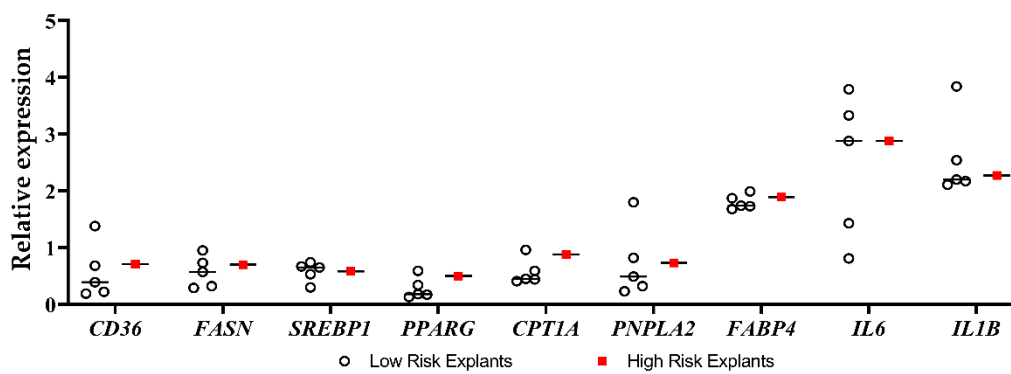


Additional File 6: Figure S2

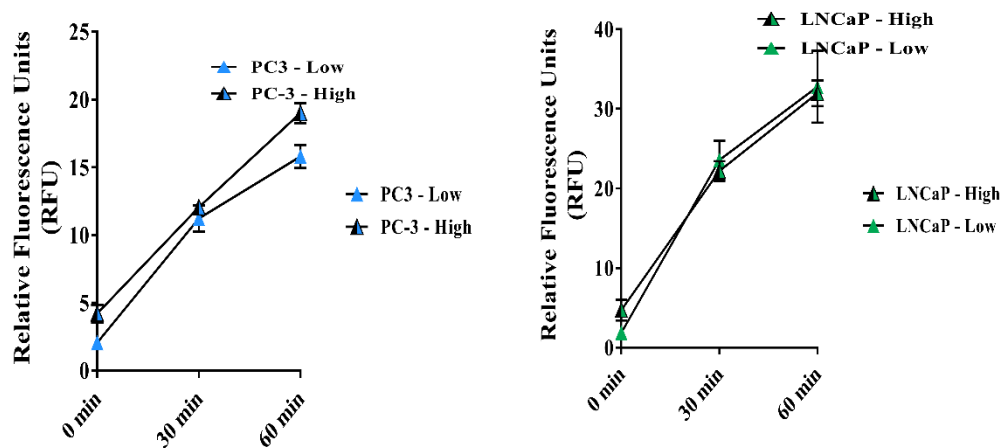
A)



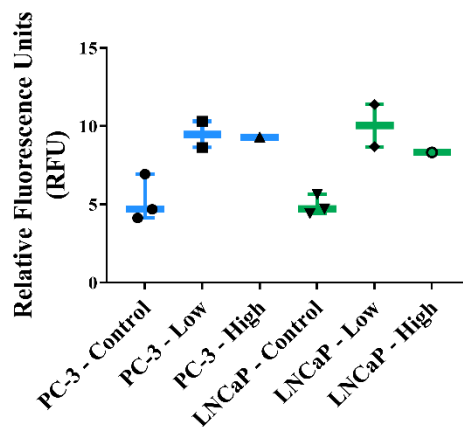
B)



C)



D)




RESEARCH

Open Access



Tumoral periprostatic adipose tissue exovesicles-derived miR-20a-5p regulates prostate cancer cell proliferation and inflammation through the *RORA* gene

Silvia Sánchez-Martin^{1†}, Antonio Altuna-Coy^{1†}, Verónica Arreaza-Gil¹, Xana Bernal-Escoté^{1,3}, Joan Francesc Garcia Fontgivell^{1,3}, Helena Ascaso-Til², José Segarra-Tomás^{1,2}, Xavier Ruiz-Plazas^{1,2†} and Matilde R. Chacón^{1,4†} 

Abstract

Background From the first steps of prostate cancer (PCa) initiation, tumours are in contact with the most-proximal adipose tissue called periprostatic adipose tissue (PPAT). Extracellular vesicles are important carriers of non-coding RNA such as miRNAs that are crucial for cellular communication. The secretion of extracellular vesicles by PPAT may play a key role in the interactions between adipocytes and tumour. Analysing the PPAT exovesicles (EVs) derived-miRNA content can be of great relevance for understanding tumour progression and aggressiveness.

Methods A total of 24 samples of human PPAT and 17 samples of perivesical adipose tissue (PVAT) were used. EVs were characterized by western blot and transmission electron microscopy (TEM), and uptake by PCa cells was verified by confocal microscopy. PPAT and PVAT explants were cultured overnight, EVs were isolated, and miRNA content expression profile was analysed. Pathway and functional enrichment analyses were performed seeking potential miRNA targets. In vitro functional studies were evaluated using PCa cells lines, miRNA inhibitors and target gene silencers.

Results Western blot and TEM revealed the characteristics of EVs derived from PPAT (PPAT-EVs) samples. The EVs were up taken and found in the cytoplasm of PCa cells. Nine miRNAs were differentially expressed between PPAT and PVAT samples. The *RORA* gene (RAR Related Orphan Receptor A) was identified as a common target of 9 miRNA-regulated pathways. In vitro functional analysis revealed that the *RORA* gene was regulated by PPAT-EVs-derived miRNAs and was found to be implicated in cell proliferation and inflammation.

[†]Silvia Sánchez-Martin and Antonio Altuna-Coy contributed equally to this work.

[†]Xavier Ruiz-Plazas and Matilde R. Chacón are joint senior authors on this work.

*Correspondence:
Matilde R. Chacón
mrch2424@gmail.com; matilde.rodiguez@iispv.cat

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Conclusion Tumour periprostatic adipose tissue is linked to PCa tumour aggressiveness and could be envisaged for new therapeutic strategies.

Keywords Periprostatic adipose tissue, Exovesicles, miRNAs, Prostate cancer, *RORA* gene

Background

Prostate cancer (PCa) is the second leading cause of cancer-related death in most Western countries [1]. Its incidence has increased markedly since the 1990s due to the use of the prostate-specific antigen (PSA) test, eating habits and, aging [2]. PCa often develops slowly and initially remains confined to the prostate, causing minimal harm. However, aggressive forms can spread to bones and lymph nodes, leading to significant morbidity and mortality [3]. A central challenge in the management of PCa is discriminating between indolent and aggressive disease. Thus, early detection of PCa is important to guide treatment strategies [4]. Research in this area aims to enhance patient outcomes through a better understanding of the molecular mechanisms underlying PCa progression.

The biology of solid tumours should be analysed considering the tumour microenvironment (TME) [5]. TME is composed of stromal cells, including fibroblasts, immune cells, endothelial cells, and extracellular matrix cells [5]. However, since many cancers develop in the vicinity of adipose tissue (AT), peritumoral adipose tissue, and its associated adipocytes have already been reported to play a role in tumour initiation, progression, and drug resistance [6].

Periprostatic adipose tissue (PPAT) is the fatty tissue surrounding the prostate gland. The thickness of this fat depot, measured by magnetic resonance [7] or ultrasonography [8] was initially proposed as an aggressiveness marker for PCa. The first molecular indications that PPAT could condition the progression of PCa came from *in vitro* experiments using media from *ex vivo* PPAT cultures applied to PCa cell lines. In these experiments, changes in cell migration behaviour were observed [9], and molecules such as chemokine CCL7 (C-C Motif Chemokine Ligand 7) secreted by PPAT-adipocytes were demonstrated to stimulate the migration of tumour cells expressing CCR3 (CCL7 chemokine receptor) [10]. Other molecules such as IL-6 (Interleukin 6), Leptin [11], MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9) [9] and TGF α (Transforming Growth Factor alpha) [12] have also been reported to be highly expressed by PPAT and implicated in PCa progression [13]. Regarding PCa treatment, it has been demonstrated that PPAT can affect the response to DCTX (docetaxel) treatment by upregulating the expression of BCL-XL (B-cell lymphoma extra-large), BCL-2 (B-cell lymphoma 2), and TUBB2B (β -tubulin isoform 2B). AG1024, a well-known IGF-1 (Insulin Like Growth

Factor 1) receptor inhibitor, counteracts the decreased response to DCTX [14].

In addition, PCa cells have been shown to uptake metabolites secreted by PPAT, such as fatty acids, and used them as an energy source [15]. *Ex vivo* co-culture experiments using explants of PPAT and PCa cells reinforced the role of PPAT in aggravating tumour aggressiveness, as the expression of adhesion and proliferative-related genes (MMP-9 and TWIST1 (Twist Family BHLH Transcription Factor 1), lipid uptake, and lipid accumulation were increased in co-cultured PCa cells [15].

PPAT can communicate with the TME through EVs which are considered to play an important role in cell-to-cell communication. These EVs are broadly classified into apoptotic bodies, exosomes, and microvesicles [16]. Although the average size of EVs subtypes is different, their size range overlaps, and current EV-isolation methods do not allow accurate separation of the EV subtypes. Therefore the operative terms for EV subtypes recommended by the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) [16] refer to a physical characteristic of EVs, such as size like: “small EVs” < 100 nm or <200 nm and “medium/large EVs” > 200 nm [17].

EVs facilitate the transfer of bioactive molecules: proteins, lipids, and nucleic acids, including miRNAs, a small non-coding RNA molecule that can regulate gene expression at the post-transcriptional level through degradation or repression and shows long-term stability in circulation [18].

Peritumoral adipose tissue derived-EVs have been demonstrated to modulate the acquisition and maintenance of cancer hallmark traits in melanoma [19] or breast cancer [20]. For instance, preadipocyte-secreted EVs that contain miR-140 have been shown to enhance breast tumorigenesis by regulating differentiation, and migration [21]. In ovarian cancer, miR-124-3p mesenchymal stem cell-derived EVs is a critical factor for inducing anti-proliferation signalling [22].

Thus, given that the presence of PPAT can favour tumour aggressiveness by mechanisms not yet fully characterized, we performed a human PPAT-derived EVs (PPAT-EVs) analysis concerning miRNA-cargo composition because this information may provide an opportunity to understand PCa progression better and may help to identify new molecular targets.

Methods

Patient recruitment and adipose tissue collection

Fresh AT samples were obtained from $n=25$ patients laparoscopically assisted with a *Da Vinci* robot surgery at the Joan XXIII University Hospital of Tarragona (Spain). Once the anterior surface of the prostate was surgically exposed, 1–2 g of the surrounding fat tissue (PPAT) from $n=24$ patients was removed for further processing. A non-tumorous extraperitoneal AT sample (1–2 g) (PVAT) was also removed during surgery from $n=17$ patients. Fat samples were immediately washed twice in 1x PBS and used for in vitro explant culture experiments. Written informed consent before their inclusion in the study was provided by all patients. The study was approved by our local ethics committee and conducted following 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). Patients were stratified based on the International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma [23] as low-risk (ISUP I and II) and high-risk (ISUP III, IV, and V). Clinical parameters, tumour aggressiveness, and metabolic status of all patients were documented (Additional File 1: Table S1 and S2). All methods were approved and performed according to the guidelines and regulations of the Ethical Committee for Clinical Research (CEIm) from Pere Virgili Research Institute (CEIM205/2020). The inclusion criteria for patients were as follows: older than 18 years, diagnosed with PCa by prostate biopsy at our centre or any other centre, and treated by radical prostatectomy at our centre. Exclusion criteria were patients with a previous history of cancer, patients older than 75 years, and those who had received any previous treatment before radical prostatectomy for PCa.

Adipose tissue explant culture

PPAT and PVAT explants were washed twice with 1x PBS supplemented with 1x antibiotic-antimycotic solution (Gibco, Fisher Scientific, Madrid, Spain) and 5 µg/mL Plasmocin (Invivogen, IBIAN Technologies, Zaragoza, Spain). Then, samples were centrifuged (280×g, 2 min, 22°C) to eliminate any remaining blood cells. Approximately 1–2 g of PPAT or PVAT explants were dissected into pieces and plated in 12 well-plates (~4–6 pieces of 4 mm per well) with M199 medium supplemented with Foetal Bovine Serum (FBS) EVs-depleted (Gibco, Fisher Scientific S.L., Madrid, Spain), 25 mM HEPES (Gibco, Fisher Scientific S.L., Madrid, Spain), 1x antibiotic-antimycotic solution (Gibco, Fisher Scientific S.L., Madrid, Spain) and 5 µg/mL Plasmocin (Invivogen, Zaragoza, Spain). Explants were cultured in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 24 h. Conditioned culture media

was then collected, filtered to exclude particles larger than 0.8 µm (Sartorius Minisart™ NML, Fischer Scientific S.L., Madrid, Spain), and frozen at -80°C until EVs were isolated.

Transmission electron microscopy (TEM)

Isolated EVs were placed on carbon-coated copper grids (200 mesh) and incubated in osmium tetroxide vapor for 15 min. Images were collected using a JEOL 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) operating at 80 kV with a Megaview III camera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Germany).

EVs uptake

PCa cells were seeded overnight in an 8-well Millicell® EZ Chamber Slide (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) at a density of 40,000 cells/cm². Subsequently, cells were depleted overnight. The PPAT-EVs were labelled with PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as indicated by the manufacturer's protocol. Cells were incubated with 20 µg/ml of PKH-67-labeled EVs at 37 °C for 1 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Conditioned M199 medium with FBS EVs-depleted was used as a negative control. After EVs treatment, cells were washed twice with 1x PBS and fixed in 3,7% (w/v) Paraformaldehyde for 1 h at room temperature. Fixed cells were washed three times with ice-cold PBS and permeabilized with 0,1% Triton X-100 for 10 min at room temperature. Then, cells were washed again three times with ice-cold 1x PBS and mounted using a coverslip with DAPI (Ibidi Mounting Medium, Planegg, Germany) to stain the cell nucleus. The images were recorded on the Leica TCS SP5 laser scanning spectral confocal microscope (Leica Microsystems Heidelberg) and further processed by FIJI (<http://fiji.sc/>) and Photoshop software.

Extraction of EVs-derived miRNAs from adipose tissue explants and qRT-PCR profiling

ExoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit (Qiagen, Bionova, Barcelona, Spain) was used to isolate EVs from 16 mL of explant culture media from 4 ISUP high-risk patients matched for age: 4 PPAT samples and their paired PVAT samples. Subsequently, miRNAs from the obtained EVs were extracted using the ExoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit (Part II: Isolation of RNA) (Qiagen, Bionova, Barcelona, Spain). miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation, and cDNA Synthesis Kit (Qiagen, Bionova, Barcelona, Spain) was used for reverse transcription. The miRNA profile contained in EVs was characterized by Quantitative Real Time Polymerase chain reaction (qRT-PCR) using ExiLent SYBR Green Master Mix in the miRCURY LNA miRNA miRNome PCR Panel, Human Panel I+II, V5 (Qiagen, Bionova,

Barcelona, Spain) that includes 752 human cancer-related mature miRNAs, according to the user's protocol on a 7900HT Fast qRT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Fluorescence readings and miRNA expression recordings were performed using SDS 2.3 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and raw microarray data were extracted by Design and Analysis Software v.2.6.0 (DA2) (Applied Biosystems). Analysis of raw microarray qRT-PCR data was performed by Geneglobe Data Analysis Software (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>). The data was normalised using UniSp3 miRNA values to eliminate inter-microarray plate differences. A cycle threshold (C_T) cut-off of <35 was applied. C_T values for each sample were normalized to the arithmetic mean of 4 miRNAs (hsa-miR-423-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, and hsa-miR-16-5p) that showed no differences between studied groups [24]. The resulting value is known as ΔC_T sample. A calibrator (a sample made by mixing several AT samples) was included for the comparison of the different groups. Thus, each miRNA, regardless of the condition, was normalized to the ΔC_T of the calibrator sample ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ sample $- \Delta C_T$ calibrator). The fold change expression of each miRNA was calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$. miRNAs with p -value ≤ 0.05 and $C_T < 35$ and, expression values ≥ 1.8 -fold or ≤ -1.8 -fold were considered for further validation analysis. Selected miRNAs were further validated in $n=24$ samples of low-risk (ISUP Group I and II) and high-risk (ISUP Group III, IV, and V) PPAT and $n=17$ PVAT samples.

***In silico* EVs-derived miRNAs target analysis, pathway, and functional enrichment prediction**

miRNet (<https://www.mirnet.ca>) was used to predict miRNA targets. Potentially altered pathways related to the targets were analysed using the Reactome database (<https://reactome.org>). The STRING database (<https://string-db.org>) was used to predict protein-protein interaction networks and to perform functional enrichment analysis. The STarMir web service (publicly available at: <https://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmirb.pl>) was used to predict miRNA binding sites on selected target genes in the 3'UTR-seed region using the human model based cross-linked immunoprecipitation prediction model. For each of the miRNA-seed sites, STarMir provides the logistic probability of miRNA: hybrid target prediction, thus, miRNAs with >1 interactions were considered for further analysis [25].

***In silico* evaluation of RORA and selected miRNAs expression**

The expression of *RORA* gene and the expression of selected miRNAs were evaluated in 52 non-pathogenic prostate tissue (NPP) and human prostate tumour tissue

(PTT) using the data collected from the Cancer Genome Atlas Prostate Adenocarcinoma Prostate Cancer Database (TCGA-PRAD) supported by the CancerMIRNome database (publicly available at: <http://bioinfo.jialab-ucr.org/CancerMIRNome/>) (Additional File 1: Table S3). CancerMIRNome database, enables interactive analysis and visualization of miRNA expression profiles based on 33 cancer types from the TCGA, making it a useful tool to identify novel dysregulated miRNAs for cancer diagnosis or prognosis. Clinical data from samples was also downloaded from the TCGA-PRAD Data Portal.

Paraffined PCa tissue RNA extraction

RNA was extracted from 6 slices of 5 μM /slice (1 cm^2) formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) of NPP and PTT. The $n=32$ paraffin-embedded samples (Additional File 1: Table S4) were obtained from the Pathology Unit at Hospital Joan XXIII in Tarragona. The extraction was performed using the MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol.

***In vitro* PCa cell experiment: transfection with miRNA inhibitors and gene silencer**

The androgen-sensitive PCa cell line (22Rv1) and the histologically normal prostate epithelial cell line (RWPE-1) were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). 22Rv1 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). RWPE-1 cells were cultured in keratinocyte serum-free medium, containing 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bovine pituitary extract and 5 ng/mL recombinant human epidermal growth factor (Gibco, Fischer Scientific S.L., Madrid, Spain). Cell cultures were supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Plasmocin® (Invivogen, Zaragoza, Spain).

For transfection with miRNA inhibitors, 22Rv1 cells were seeded in 12-well or 6-well plates at 49.429 cells/ cm^2 for RNA or protein analysis, respectively. Twenty-four hours later, the medium was removed, and cells were transfected with 5, and 15 nM miRNA inhibitors (hsa-miR-20a-5p miRCURY LNA miRNA Power Inhibitor (i20a-5p), and hsa-miR-106b-5p miRCURY LNA miRNA Power Inhibitor (i106b-5p), using Lipofectamine 2000, P3000 reagent, and Optimem (Thermo Fisher, Madrid, Spain) according to the manufacturer's protocol.

For gene silencing assays, 22Rv1 cells were seeded in 24-well plates at 47.897 cells/ cm^2 density. After 24 h, the medium was removed, and the cells were transfected with 10, 25, and 50 nM of the *RORA* small interfering RNA against all isoforms (siRORA: Silencer Select Pre-designed siRNA *RORA*; s12103, Ambion, Thermo Fisher), using Lipofectamine 2000 and Optimem. A negative control inhibitor (iNC: Negative control A miRCURY LNA miRNA Power Inhibitor Control; Qiagen, Madrid,

Spain) and a non-target control small interfering RNA (siNC: Silencer[®]Select Negative Control siRNA; Ambion, Thermo Fisher) were used for comparative analyses.

Cells were collected after 24 h of transfection for RNA analysis or after 48 h for protein analysis.

Gene and miRNAs expression analysis in cell extracts

Total RNA was isolated from PCa cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Bionova, Barcelona, Spain).

For gene expression, cDNA was synthesized from total RNA using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). qRT-PCR was performed on a QuantStudio 7 Pro (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) using TaqMan Universal PCR Master Mix Fast Advanced (Applied Biosystems, Fisher Scientific S.L., Madrid, Spain) and the following TaqMan assays: *RORA* (covers all 4 isoforms) (Hs00536545_m1) and *TNF- α* (Tumor Necrosis Factor; hs99999043_m1). The thermal cycle conditions were: 50°C for 2 min (Uracil-N glycosylase activation), 95°C for 2 min (Polymerase activation), and 40 cycles of 95°C for 1 s (denaturation) and 60°C for 20 s (annealing/extension). Raw data were extracted by DA2 software. In the paraffin samples, C_T values for *RORA* gene expression were normalized to the expression of 2 housekeeping genes: *UBA52* (Hs02835948_m1) (Ubiquitin A-52 Residue Ribosomal Protein Fusion Product 1) and *B2M* (Hs00187842_m1) (Beta-2-Microglobulin) [26, 27], while in PCa cell lines, C_T values for the *RORA* gene expression were normalized to *PPIA* (Hs99999904_m1) (Peptidylprolyl Isomerase A) as housekeeping.

For miRNA expression, the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation, and cDNA Synthesis Kit (Qiagen, Bionova, Barcelona, Spain) was used for reverse transcription. qRT-PCR was performed on a QuantStudio 7 Pro (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) using ExiLent SYBR Green Master Mix (Qiagen, Bionova, Barcelona, Spain), and the following TaqMan assays were used: hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-93-5p, and hsa-miR-17-5p. Hsa-miR-423-5, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, and hsa-miR-16-5p expressions were used to normalize C_T miRNA values. The thermal cycle conditions were: 95°C for 2 min (Polymerase activation), 40 cycles of 95°C for 10 s (denaturation), and 60°C for 1 min (annealing/extension).

All results were analysed using the comparative C_T method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) and the data were expressed as an n-fold difference relative to a calibrator sample.

Western blotting

The concentrated EVs and homogenised 22Rv1 cells were ultrasonicated 3 times during 1 min at a frequency of 50 kHz with a UP 200s Ultraschallprozessor sonic

processor (Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany). Total protein was quantified using the Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA).

EVs surface molecules characterization

10 μ g of protein isolated from PPAT-EVs, as well as, 10 μ g of extract from human adipocyte cells, were resuspended in reducing sample buffer, boiled for 5 min at 95°C, 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 with mouse monoclonal antibody for α -tubulin (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) at 1/1000 dilution. HRP-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (both from Pierce, Thermo Fisher Scientific) were used as secondary antibodies at 1/500 dilution.

RORA protein analysis

25 μ g of protein from 22Rv1 cells was electrophoresed on a 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes, blocked, and incubated with Anti-RORA mouse monoclonal antibody (sc-518,081; Santa Cruz, Spain) at 1/500 dilution and Anti- β -Actin mouse monoclonal antibody (clone AC-74; Sigma-Aldrich, Germany) at 1/1500 dilution. The purified Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP-Conjugate was used as a secondary antibody (Pierce/Thermo Fisher) at 1/2000 dilution.

In both cases, chemiluminescent western blot detection was developed with SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce Biotechnology, Boston, MA, USA) except for β -actin, which was developed with West Pico (Pierce Biotechnology). Images were quantified with VersaDoc Imaging System using Quantity One software (Bio-Rad, Barcelona, Spain) following the manufacturer's instructions, and normalized to the amount of β -actin and α -tubulin for RORA protein analysis, and EVs characterization respectively.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was determined using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). 22Rv1 cells were seeded at 26.316 cells/cm² on 24-well plates and incubated for 24 h. Cells were then transfected with 15 nM miRNA inhibitors (i106b-5p or i-20a-5p) and/or 50 nM siRORA, as commented above. iNC and siNC were included as controls. Cell viability was measured at 24, 48, 72, and 96 h. At each time point, the culture medium was discarded, and 500 μ l of fresh culture media was added, mixed with 50 μ l of the CCK-8 reagent, and incubated at 37°C for 2 hours. The media was then collected, and the absorbance was measured at a wavelength of 450 nm using a multi-mode microplate reader (BioTek).

Statistical analysis

For the pilot miRNAs microarray study, sample size was calculated following the MdaAnderson bioinformatic software (<https://bioinformatics.mdanderson.org/MicroarraySampleSize/>). Briefly, based on the measurement of 752 miRNAs, considering 50 false positives, 2-fold-change differences between sample groups, a standard deviation of 0.5, and an estimated power analysis of 0.9, the minimum sample size required was calculated to be 4 patients in each group.

For miRNA and gene validation analysis in paraffin samples, the sample size was calculated using G*Power 3.1.9.7. Assuming a change of 2-fold between groups and similar group variances, with an average power >90% and a false discovery rate of 5%, a minimum of 19 patients was calculated to be needed in each group. The normality of the anthropometric and clinical variables was analysed with the Shapiro-Wilk test. The data is shown as the median with an interquartile range.

Clinical variables with non-normal distributions are reported as medians and interquartile ranges. To compare miRNA expression levels between PVAT ($n=17$) and PPAT ($n=24$) samples, only 16 samples were matched pairs from the same patients. Given the absence of a pre-and-post intervention effect, paired data analysis was deemed inappropriate. Therefore, the Mann-Whitney U test was employed to assess differences between the two patient groups.

In vitro experimental results are presented as the mean and standard error of the mean (SEM) of 3–4 independent experiments. Differences were tested with the unpaired two-tailed Student's t-test. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 22 (SPSS, Chicago, IL). GraphPad Prism 7.0 was used for the box plot representation.

Results

EVs from peritumoral adipose tissue are actively internalized by PCa cells

To investigate whether EVs are secreted by PPAT and play a role in the communication with PCa cells, we purified small/medium sized EVs from the supernatant of PPAT explants after overnight culture (Additional File 1: Table S1 and S2). Isolated EVs were observed under TEM and showed the characteristics of small EVs, with a typical appearance and diameter ranging from 30 to 200 nm (Fig. 1A). Enrichment for EVs marker CD9, CD81, and the absence of the cell-specific marker tubulin was demonstrated by Western blot (Fig. 1B). The detailed results of immunoblotting are shown in Additional File 2: Figure S1.

To examine if 22Rv1 PCa cells might be targets of PPAT-EVs, a lipid-associating fluorescent dye, PKH67, was used to label EVs preparations and then incubated

with PCa cells. EVs uptake was observed 1 h after treatment and was found to accumulate in PCa cells over time (Fig. 1C). Collectively, we showed that PPAT cells secrete EVs, which are actively incorporated *in vitro* by PCa cells.

EVs derived from human PPAT revealed a unique miRNA profile

We searched the miRNA contained in EVs to find epigenetic regulators of PCa progression. The miRNA-profile search was divided into two phases: the initial pilot phase using AT from 4 PCa patients (Additional File 1: Table S1) and the validation phase using AT from 25 PCa patients (Additional File 1: Table S2). Thus, we first analysed miRNA expression from PPAT-EVs and PVAT-derived EVs (PVAT-EVs) samples using a qRT-PCR array of 752 miRNA target onco-miRNAs (Additional File 3: Raw data pilot study). Ten miRNAs were differentially expressed in PPAT-EVs vs. PVAT-EVs (p -value ≤ 0.05 , $C_T < 35$ and expression values ≥ 1.8 -fold or ≤ -1.8 -fold): hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-106a-5p, and hsa-miR-106b-5p. Moreover, the hsa-miR-126-3p with $p < 0.1$ was also selected because it met the requirements. Hence, these eleven selected miRNAs were further validated using a larger sample size (Additional File 1: Table S2). Analysis of the expression patterns of these eleven selected miRNAs revealed significant differences in 8 of them: hsa-miR-17-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-106b-5p, and hsa-miR-18a-5p when comparing PVAT-EVs vs. PPAT-EVs, and hsa-miR-106a-5p ($p=0.006$) was close to significance (Fig. 2) (see C_T values in Additional File 3: Raw data validation study). When comparing the miRNA content of PVAT-EVs in terms of risk, the following miRNAs were up-regulated in low-risk PPAT-EVs: hsa-miR-17-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-106b-5p, and hsa-miR-18a-5p. While when comparing PVAT and high-risk PPAT-EVs, hsa miR-106b-5p was found significantly reduced. Hsa-miR-18a-5p was the only differentially expressed between PPAT-low risk vs. PPAT-high risk. No significant differences were detected for hsa-miR-106a-5p (Fig. 2).

Differences were observed when samples were segregated by ISUP grade. Between ISUP II and PVAT-EVs, significant differences were found for hsa-miR-17-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-93-5p, and hsa-miR-18a-5p. Between ISUP I and PVAT-EVs, significant differences were observed for hsa-miR-18b-5p and hsa-miR-18a-5p. Additionally, between ISUP III and PVAT-EVs, significant differences were found for hsa-miR-106b-5p and hsa-miR-93-5p. No significant

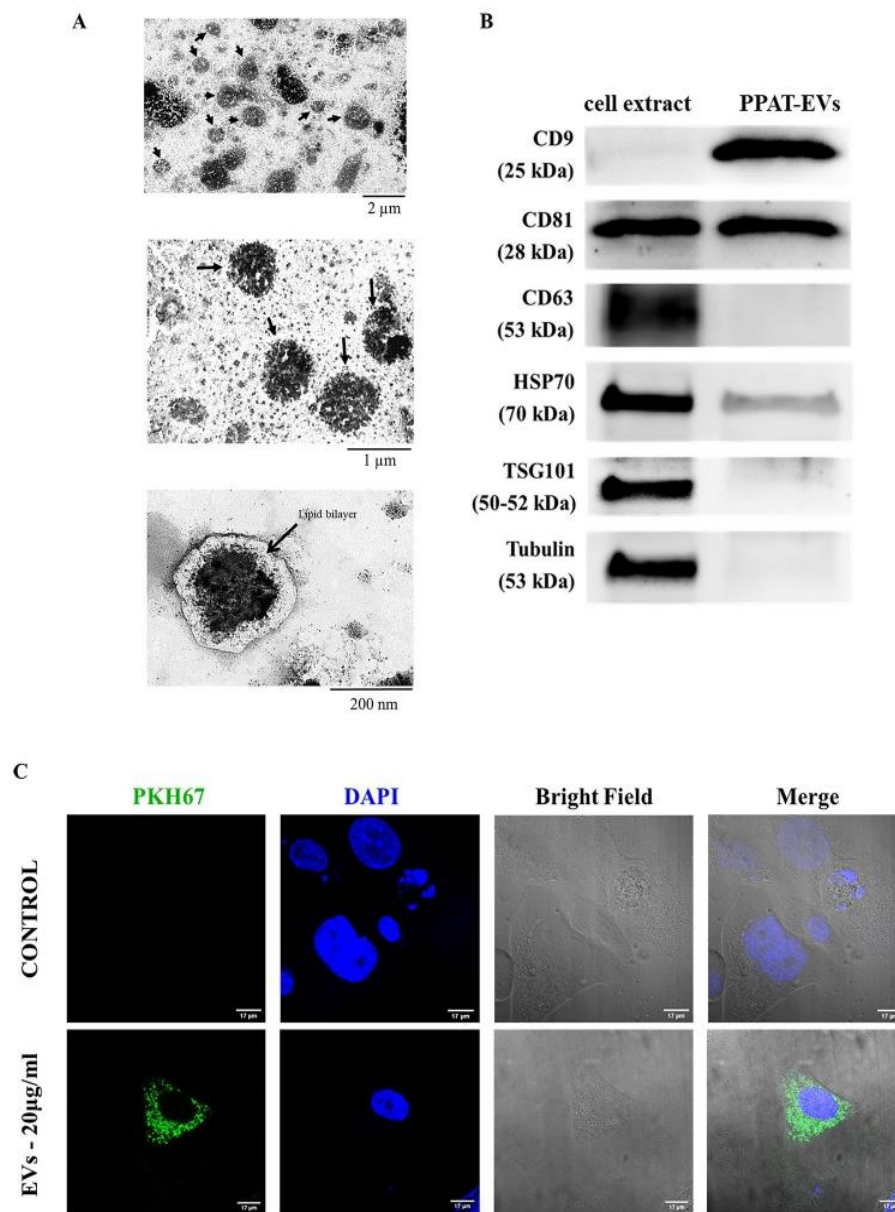


Fig. 1 Characterization of isolated EVs. **A** Analysis of isolated extracellular vesicles (EVs) by transmission electron microscopy at different magnifications. **B** Western blot image of protein extracts prepared from isolated PPAT-derived EVs (PPAT-EV) and total adipocyte cell extract; tested with the following antibodies: CD9, CD81, CD63, HSP70, TSG101, and tubulin. (The uncropped Western Blot image is available in Additional File 2: Figure S1). **C** PPAT-EVs (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) uptake by PCa cells captured by confocal spectral microscope. PKH67 (green dye) labelled PPAT-EVs and DAPI (blue dye) labelled the cellular nucleus

differences were found among the different ISUP grades (Additional File 4: Figure S2).

RAR related orphan receptor A (*RORA*) gene is a common target of the putatively deregulated EVs-derived miRNAs

To better understand the function and mechanism of deregulated PPAT-EVs-derived miRNA in gene function, we searched for putative miRNA-target interactions using miRNet analysis software. The program was directed to identify target genes according to miRTarBase v8.0 and TarBase v8.0. After evaluating the 9 deregulated

miRNAs, the software found that this combination was involved in the post-transcriptional regulation of 4 putative key genes: *RORA* and 3 Zinc Finger Proteins (*ZNF134*, *ZNF217* and *ZNF264*) (Fig. 3A). Based on this, we used Reactome software to examine the signalling pathways in which these genes might be engaged. Interestingly, we observed that the *RORA* gene was consistently identified in most of the most significant deregulated pathways (Fig. 3B), selecting this gene as a common target of the putatively deregulated PPAT-EVs-derived miRNAs. By analysing the STRING protein-protein

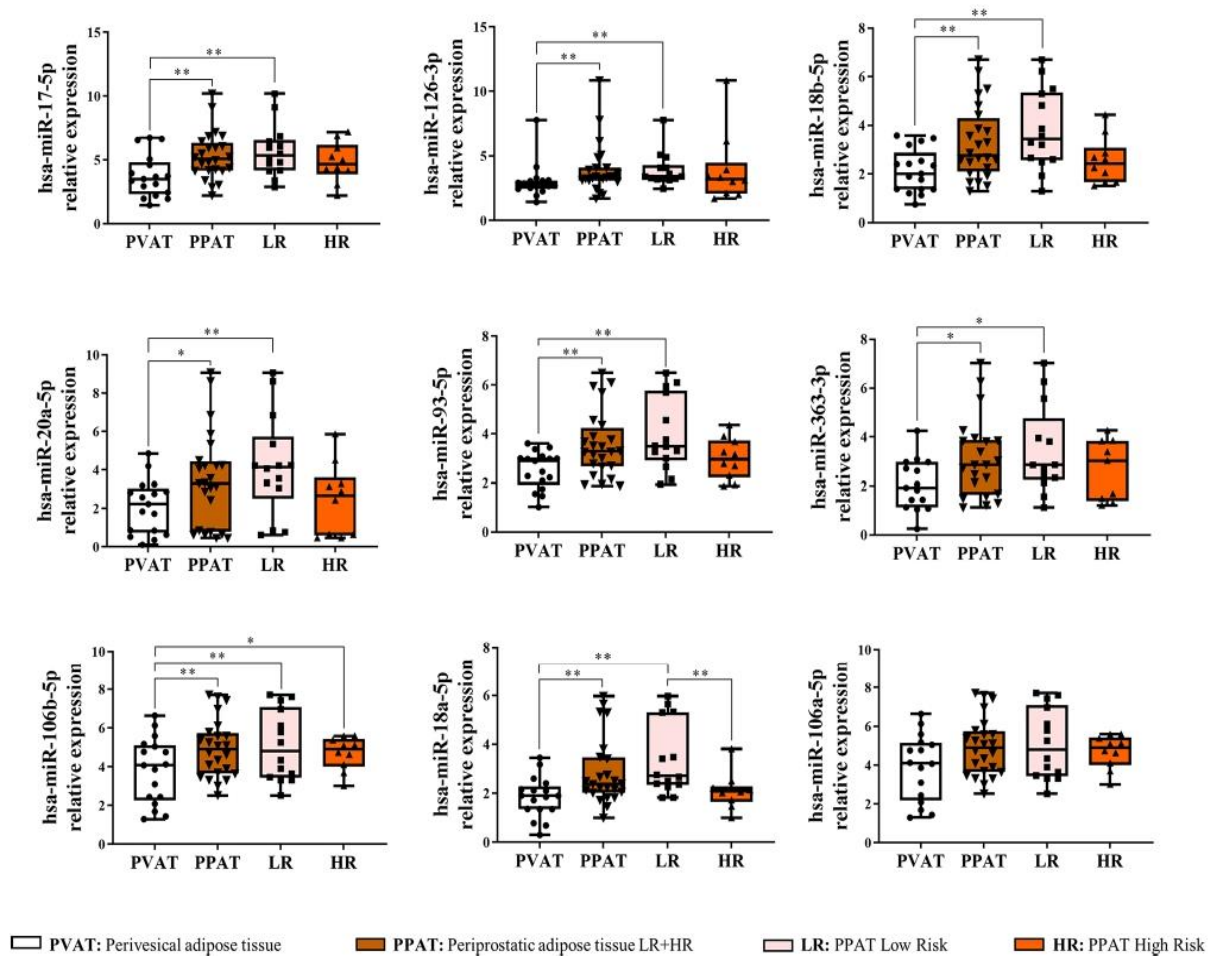


Fig. 2 EVs-derived miRNAs are differentially expressed in PPAT from patients with prostate cancer. Box plots showing median, quartiles, and extreme values of relative expression of the nine discriminatory miRNAs in PPAT-EVs compared to PVAT-EVs. Adipose tissue samples were segregated according to ISUP grade in LR (Low-Risk; ISUP I and II) and HR (High-Risk; ISUP III, IV, and V). Symbols: *indicates significant differences, * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01

interaction data base, we searched for its putative protein interaction network. The STRING search results showed 10 putative proteins with interaction scores between 0.9 and 1 that the model considered to be true. The 10 proteins were mainly related to cell growth (KAT5, STAT3), differentiation, inflammation, and apoptosis (BCL6), T cell differentiation (BATF), hypoxia, angiogenesis, and tumour metastasis (HIF1A), and circadian cycle (ARNTL, Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1; NR1P1, Nuclear Receptor Interacting Protein 1; NPAS2, Neuronal PAS Domain Protein 2; CLOCK, Clock Circadian Regulator) (Fig. 3C and Additional File 5: Figure S3). We then checked the prediction of the deregulated miRNAs binding sites in the *RORA* gene using the STarMir web server. Binding sites for 8/9 miRNAs were detected in all 4 *RORA* gene variants, but no binding was uploaded for miR-363-3p. This is shown in Fig. 3D as the sum of all logistic probability of binding (LogitProb) of all 4 *RORA* gene variants in the 3'UTR seed region of each miRNA (see detail binding sites in Additional File 6: Figure S4).

Thus, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-93-5p, and hsa-miR-17-5p were selected as the most relevant regulatory miRNAs of the *RORA* gene according to the best LogitProb obtained and considering the different expression patterns of miRNA content in PPAT- EVs and PVAT- EVs.

Expression of *RORA* gene and putatively regulating miRNAs in PCa human samples

The expression levels of the *RORA* gene and the expression levels of the most relevant miRNAs (hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-93-5p, and hsa-miR-17-5p) were uploaded from prostate tumour tissues (PTT) and non-pathogenic prostate tissues (NPP) obtained in the CancerMIRNome database (<http://bio-info.jialab-ucr.org/CancerMIRNome/>).

Anthropometric and clinical characteristics from the CancerMIRNome patient database are shown in Additional File 1: Table S3. Paired samples of PTT and NPP tissue from 52 selected patients were retrieved from the

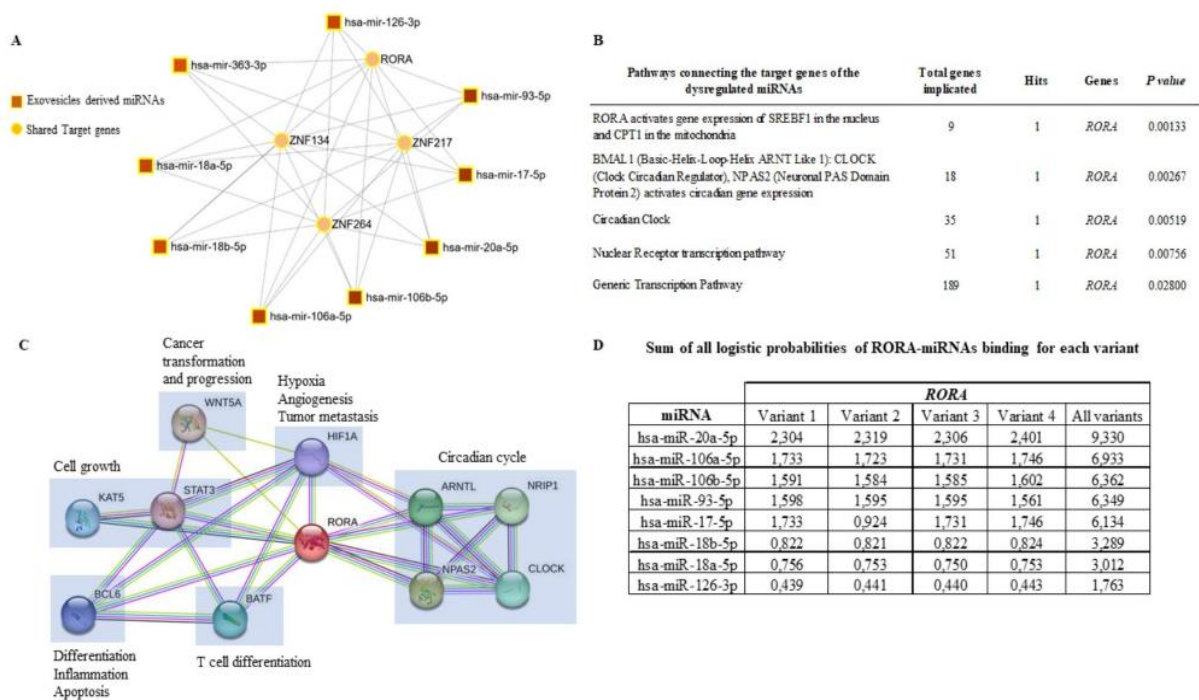


Fig. 3 Gene-target and protein pathway regulatory networks of the selected miRNA. *In silico* analysis. **A** miRNet analysis showing that *RORA*, *ZNF134*, *ZNF217* and *ZNF264* genes were identified as common target of the putative miRNA-regulated pathways according to miRTarBase v8.0 and TarBase v8.0. **B** Reactome pathway analysis displaying the significant pathways connecting target genes of the dysregulated miRNAs. **Legend.** Total genes implicated: number of genes annotated in the Reactome; Hits: Number of genes resulting from the miRNet analysis involved in the corresponding pathway; Genes: Genes involved. **C** *RORA* protein-protein interacting network performed by STRING analysis. Network representing protein-protein associations (blue interactions are known from curated databases, pink is known experimentally determined, green is text mining and black are co-expression) (See Additional File 5: Figure S3 for more detailed information of each protein in the node). **D** Table illustrating the logistic probabilities of *RORA*-miRNA binding for each *RORA* gene variant (See Additional File 6: Figure S4 for more detailed information of each miRNA seed-gene binding site)

PRAD (Prostate Adenocarcinoma) project included in the TCGA. When analysing *RORA* gene expression in the selected samples, significantly lower expression levels were observed in PTT samples compared to NPP tissue. This reduction in the *RORA* gene expression was evident when comparing NPP to both PTT-low-risk and PTT-high-risk samples (Fig. 4A). However, no differences were observed in *RORA* gene expression levels between low and high-risk PTT (Fig. 4A). Interestingly, our analysis of the expression of selected miRNAs (hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-93-5p, and hsa-miR-17-5p) in 52 paired CancerMIRNome samples revealed that the expression patterns in NPP vs. PTT tissues closely mirrored those observed in PVAT-EVs vs. PPAT-EVs samples (Fig. 4A).

We then validated the *in-silico* results obtained from CancerMIRNome for the *RORA* gene expression and selected miRNAs in 32 paraffined tissue samples from PCa patients (Additional File 1: Table S4). The results confirmed the down-regulation of the *RORA* gene expression levels in PTT compared to paired NPP tissue. Regarding miRNA expression, the upregulation of hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p, and hsa-miR-93-5p

was corroborated when comparing NPP to PTT, NPP to PTT-low-risk, and NPP to PTT-high-risk. However, no significant differences were detected between NPP and PTT-high-risk for hsa-miR-20a-5p. Additionally, no differences were observed for hsa-miR-17-5p across the sample comparisons (Fig. 4B).

RORA is a target gene of hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106b-5p

To investigate whether hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-93-5p, and hsa-miR-17-5p target the *RORA* gene, we utilized the RWPE-1 cell line as a control, representing healthy prostate epithelial cells. Additionally, we used the 22Rv1 cell line, an androgen-sensitive PCa cell model, which closely mimics the *in vivo* conditions of our samples. This selection is pivotal, as all our PPAT samples are derived from androgen-sensitive tumours, thereby ensuring an accurate replication of the relevant biological context. First, we checked *RORA* gene expression in both cell lines, and we found that it was significantly down-regulated in the 22Rv1 PCa cell line compared to the control RWPE-1 cell line (Fig. 5A). Then, we analysed the expression levels of hsa-miR

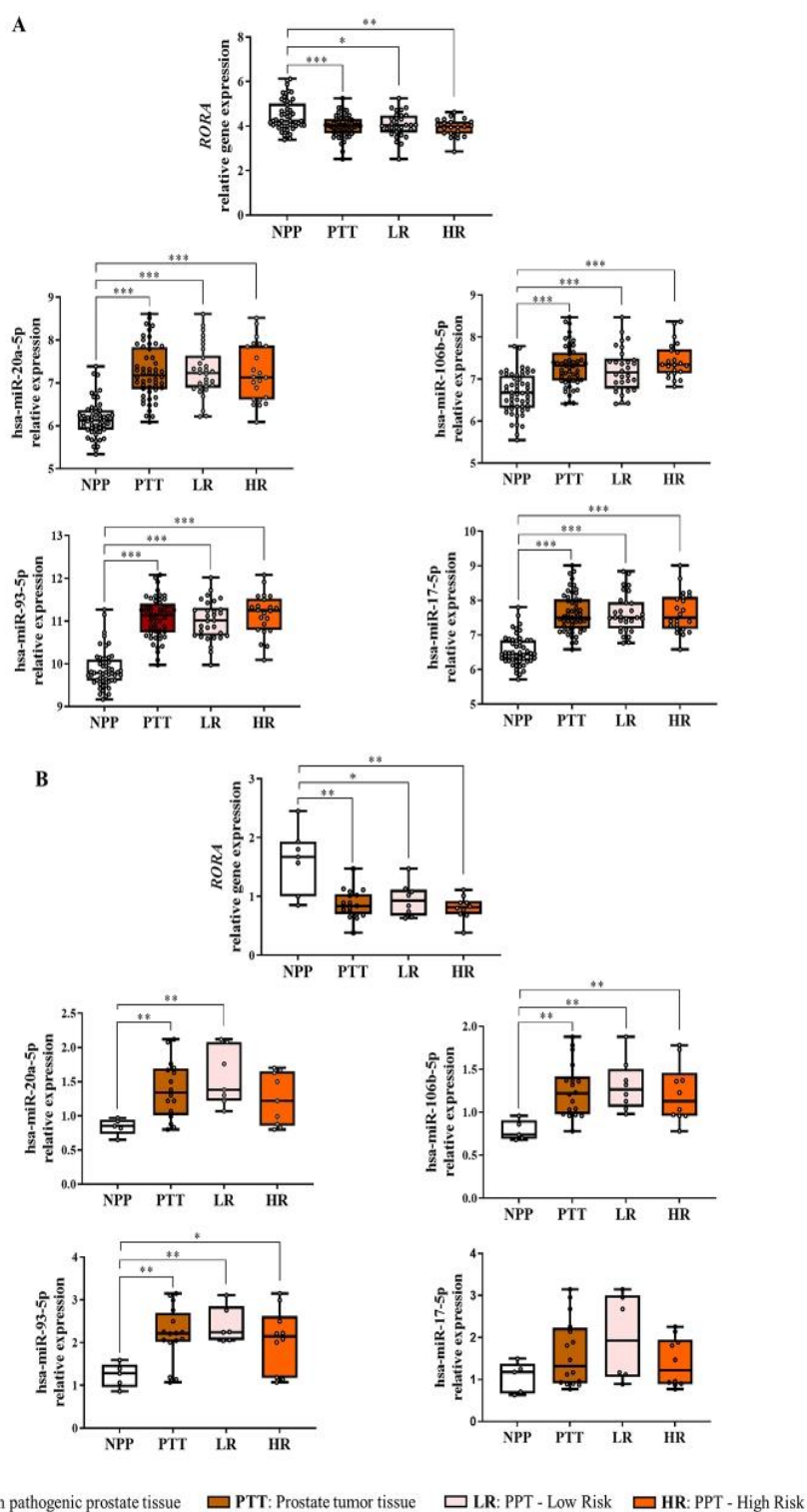


Fig. 4 *RORA* gene and miRNAs expression in PCa tissues. **A** *RORA* and miRNAs expression level analysis in non-pathogenic prostate tissue (NPP) vs. PCa tissue samples (PTT) classified as LR (Low-Risk; ISUP I and II) and HR (High-Risk; ISUP III, IV, and V) using CancerMIRNome database (the y-axis relative units are: $\log_2\text{CPM} = \text{Counts per Million of gene reads}/\text{total reads} \times 10^6$). **B** *RORA* and miRNAs expression level analysis in NPP vs. PTT classified as LR (Low-Risk; ISUP I and II) and HR (High-Risk; ISUP III, IV and V) using human prostate tissue paraffin blocks. Each box shows the median, quartiles, and extreme values. Symbols: * Indicates significant differences, * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001

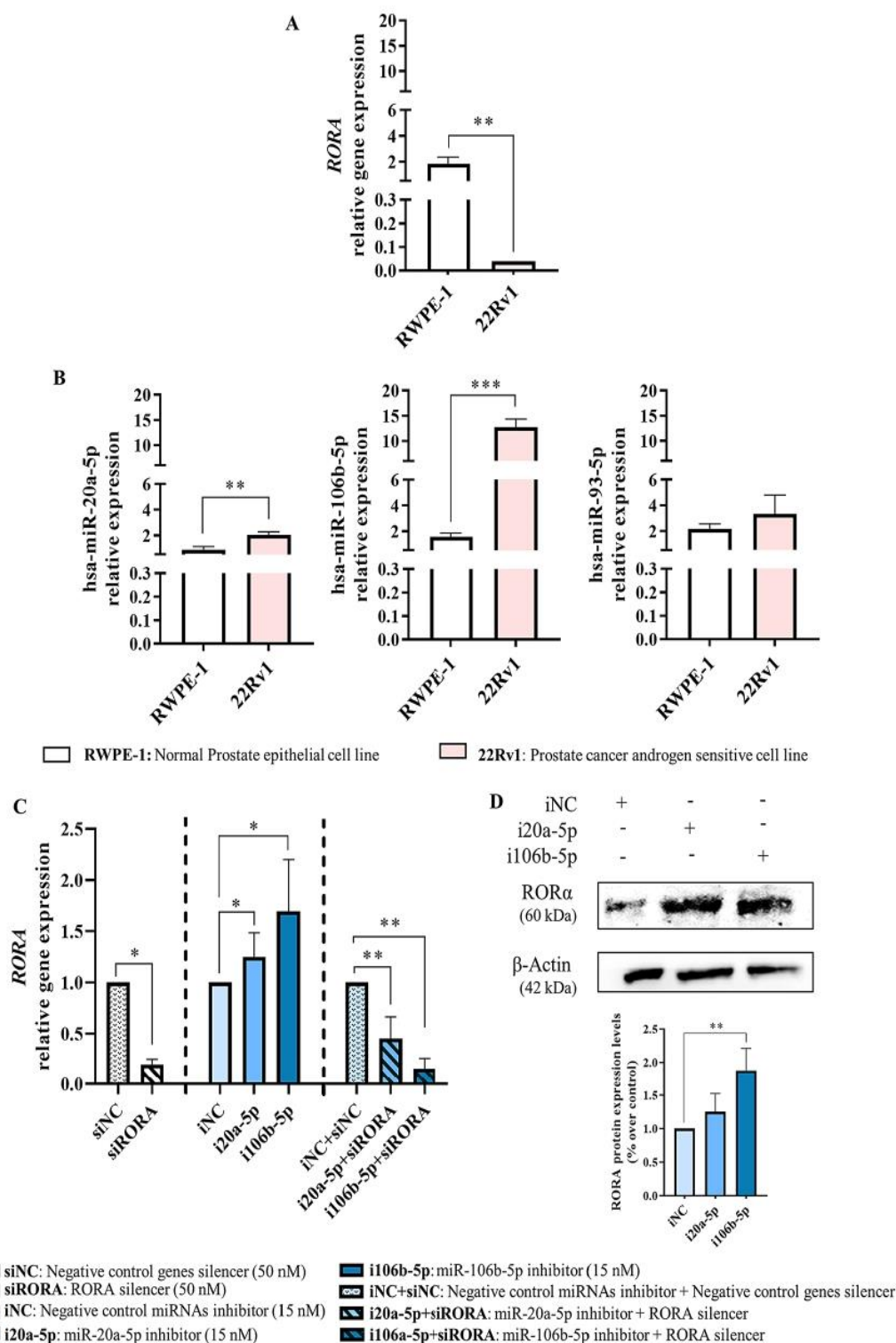


Fig. 5 hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106b-5p regulate the *RORA* gene and protein expression in PCa cells. **A** Study of *RORA* and **B** miRNAs expression in histologically normal prostate epithelial cell line (RWPE-1) and the androgen-sensitive PCa cell line (22Rv1). **C** *RORA* gene expression levels in 22Rv1 transfected with siRORA, miR-20a-5p inhibitor (i20a-5p) or miR-106b-5p inhibitor (i106b-5p) and co-transfected with siRORA and either i20a-5p or i106b-5p. **D** *RORA* protein expression in 22Rv1 cells transfected with i20a-5p or i106b-5p inhibitor. A representative Western blot is presented (top). The membranes were tested with the corresponding antibodies. Expression levels were normalized to β -actin, then miRNAs expression levels were normalized to negative control inhibitor (iNC). Full-length blot and gel are presented in Additional File 8: Figure S6. Working concentration for siRORA was 50 nM, and for i20a-5p or i106b-5p was 15 nM. Symbols: * indicates significant differences, **p*-value < 0.05; ***p*-value < 0.01; ****p*-value < 0.001

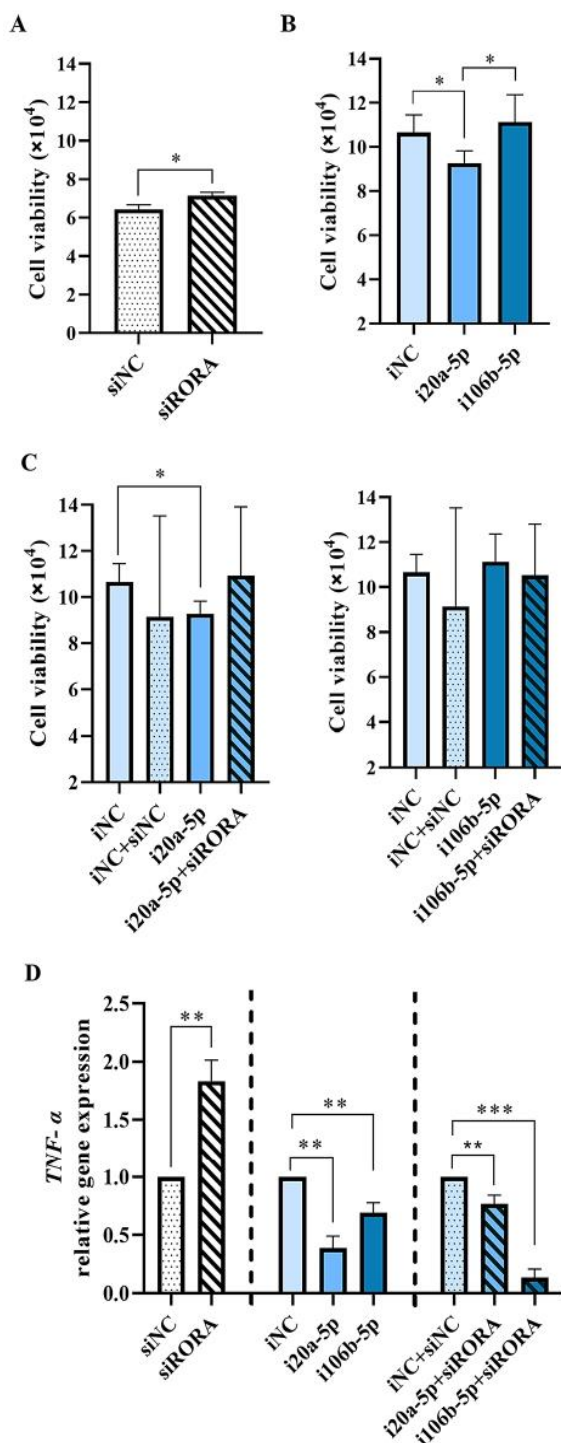


Fig. 6 hsa-miR-20a-5p alters proliferation and inflammation by targeting *RORA* gene in 22Rv1 PCa cells. **A–C** Cell proliferation studies in 22Rv1 after transfection with siRORA at 96 h, and with miR-20a-5p inhibitor (i20a-5p) or miR-106b-5p inhibitor (i106b-5p) at 72 h or in combination (siRORA plus corresponding miRNA inhibitor). **D** *TNF- α* mRNA expression levels in 22Rv1 transfected with siRORA, miR-20a-5p inhibitor (i20a-5p) or miR-106b-5p inhibitor (i106b-5p) alone or in combination. Symbols: * indicates significant differences, **p*-value < 0,05; ***p*-value < 0,01; ****p*-value < 0,001

20a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-93-5p, and hsa-miR-17-5p in both cell lines. Expressions of hsa-miR 20a-5p and hsa-miR-106b-5p were found to be significantly upregulated in the 22Rv1 cell line compared to RWPE-1 cell line, whereas no significant differences were observed for hsa-miR-93-5p (Fig. 5B). The expression of hsa-miR-17-5p showed very high Ct values (>37) and was considered not expressed.

We then selected the 22Rv1 cell line and the significantly up-regulated miRNAs (hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106b-5p) (Fig. 5B) to validate our in-silico findings that suggest a link between these miRNAs and *RORA* gene expression regulation. To evaluate this hypothesis, using an effective dose of gene silencer (50 nM), we found that *RORA* gene expression was significantly decreased (Additional File 7: Figure S5A). Then, we transiently inhibited hsa-miR 20a-5p (i20a-5p) and hsa-miR-106b-5p (i106b-5p) using an effective miRNA inhibitor dose (15 nM) (Additional File 7: Figure S5B) and we detected a significant upregulation of *RORA* mRNA expression (Fig. 5C). Moreover, to further evaluate the role of these miRNAs in *RORA* mRNA expression, we inhibited *RORA* gene (siRORA) and hsa-miR-20a-5p/hsa-miR106b-5p simultaneously; and we found that when *RORA* gene and hsa-miR-20a-5p were simultaneously inhibited (i20a-5p+siRORA), *RORA* gene expression significantly decreased compared with cells treated with iNC+siNC pointing out that hsa-miR-20a-5p may have a modulatory role over *RORA* gene expression. Simultaneous inhibition of the *RORA* gene and hsa-miR-106-5p (i106b-5p+siRORA) also show a significant effect as compared to control iNC+siNC. Similar data was obtained on *RORA* protein expression when i106b-5p was used, but only a trend ($p=0.17$) was observed for i20a-5p (Fig. 5D) (western blot details can be found in Additional File 8: Figure S6). No protein expression was detected when the *RORA* gene was silenced or when both *RORA* gene and hsa-miR-20a-5p/hsa-miR106b-5p were co-inhibited simultaneously.

RORA gene inhibits inflammation and proliferation in PCa cells through hsa-miR-20a-5p

To investigate whether PPAT-EVs derived miRNAs, hsa-miR-106b-5p and hsa-miR-20a-5p, could regulate inflammation and proliferation in the 22Rv1 PCa cell line by targeting *RORA* gene, we silenced simultaneously and individually *RORA* gene expression and hsa-miR-106b-5p/hsa-miR-20a-5p correspondingly (Fig. 6).

The effect of hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106-5p on PCa cell proliferation through *RORA* gene was evaluated (Additional File 9: Figure S7). First, we observed that silencing the *RORA* gene with siRORA, induced a significantly increased 22Rv1 cell proliferation (Fig. 6A). Then, we inhibited hsa-miR-20a-5p, and a decrease in

cell proliferation was observed, while hsa-miR-106b-5p inhibition did not affect cell proliferation (Fig. 6B). When we simultaneously inhibited the *RORA* gene and hsa-miR-20a-5p (siRORA+i20a-5p), cell proliferation was partially increased, indicating that hsa-miR-20a-5p regulates PCa cell proliferation through the *RORA* gene (Fig. 6C). Inhibition of the *RORA* gene and hsa-miR-106b-5p (i106b-5p+siRORA) did not show any effect on 22Rv1 cell proliferation (Fig. 6C).

RORA gene silencing resulted in increased *TNF- α* mRNA gene expression, which was decreased when hsa-miR-106b-5p and hsa-miR-20a-5p were inhibited (Fig. 6D). The hsa-miR-20a-5p inhibition (i20a-5p) had a higher reduced expression effect on *TNF- α* mRNA levels, although no significant differences were observed when comparing the inhibitory effect on *TNF- α* between hsa-miR-106b-5p and hsa-miR-20a-5p (Fig. 6D). Interestingly, when the *RORA* gene expression and hsa-miR-20a-5p were inhibited simultaneously (i20a-5p+siRORA), *TNF- α* mRNA expression was partially rescued (Fig. 6D), while no compensatory effect was observed when hsa-miR-106b-5p and the *RORA* gene were silenced simultaneously (i106b-5p+siRORA) (Fig. 6D).

Discussion

Trafficking of EVs in the TME has been found to be altered during cancer progression [28]. In this microenvironment, PPAT-EVs have been demonstrated to modulate cancer features [19, 20], partly driven by their miRNA contents; an issue scarcely investigated in the context of PCa AT microenvironment. Therefore, in this study, we evaluated, for the first time to our knowledge, the involvement of miRNAs contained in EVs secreted by human PPAT in the progression and aggressiveness of PCa tumour.

We used a battery of tests to ensure that the isolated miRNAs originated from PPAT-EVs, including protein expression of EVs surface markers, as recommended by the ISEV [29], and size characterization, which revealed uniformity in size distribution.

Microarray analysis identified 9 differentially expressed miRNAs derived from PPAT-EVs compared to those miRNAs derived from PVAT-EVs samples (hsa-miR-17-5p, -126-3p, -18b-5p, -20a-5p, -93-5p, -363-3p, -106b-5p, -18a-5p, and -106a-5p). Remarkably, all miRNAs were significantly more abundant in the PPAT-EVs samples than in the PVAT-EVs samples. Interestingly, when PPAT-EVs were analysed based on PCa aggressiveness, no differences were observed in miRNA content between low-risk and high-risk PPAT-EVs. However, miRNA expression in low-risk PPAT-EVs was significantly higher compared to PVAT-EVs, a difference that was not observed when comparing high-risk PPAT-EVs to PVAT-EVs. The higher expression of these miRNAs in

low-risk PPAT-EVs, especially in lower ISUP grades, may indicate an active suppression of tumour progression by these miRNAs. As the tumour becomes more aggressive (higher ISUP grades), it might down-regulate these miRNAs to evade their suppressive effects. Overall, this observation reinforces the impact of the tumour on its microenvironment, and particularly the effect of peritumoral AT, as suggested in other types of tumours like breast [30].

The miRNA network analysis of selected PPAT-EVs miRNAs identified four potential shared target genes: RAR Related Orphan Receptor A (*RORA*) and three Zinc Finger Proteins (*ZNF134*, *ZNF217*, and *ZNF264*). In addition, pathway enrichment analysis identified the *RORA* gene as a common denominator of all the putatively deregulated pathways. The *RORA* gene or also called NR1F1 (nuclear receptor subfamily 1, group F, member 1) is a transcription factor that plays a critical role in the regulation of various biological processes, including circadian rhythm, metabolism, and inflammation [31]. Recent studies have suggested that *RORA* may also be involved in PCa progression [32], even a *RORA* polymorphism rs17191414 has been associated with PCa risk, however, this data needs to be validated in other cohorts [33].

RORA gene is composed of 15 exons, located in the middle of chromosome 15q22.2. As endogenous ligands, cholesterol and derivatives have been appointed [31, 34]. This gene is generated by splicing, giving rise to four isoforms ($\alpha 1$ to $\alpha 4$) in humans that differ in the N-terminal region [35–37]. Variant 1 ($\alpha 1$) is expressed in healthy breast, brain, prostate, liver, and ovarian tissue. In the prostate, the main variants found are $\alpha 1$ and $\alpha 4$ [38].

Our results demonstrated that the most relevant PPAT-EV deregulated miRNAs (hsa-miR20a-5p, -106b-5p, -93-5p, and -17-5p), selected according to the best logistic seed binding probability and by their expression patterns in PPAT-EVs, can all bind to the 4 *RORA* variants in the 3'UTR region. Furthermore, their expression levels were upregulated in PCa tissue samples compared to non-pathogenic prostate tissue samples, as retrieved from the CancerMIRNome database, and corroborated by our cohort of paraffin embedded PCa samples. The expression patterns of hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106b-5p were also replicated in the 22Rv1 cancer cell line, showing higher expression than in the healthy RWPE-1 cell line. Additionally, *RORA* gene expression was reduced in prostate tumour tissues, and in PCa cells compared to normal tissue or healthy prostate cells, a feature confirmed by other authors [38].

Given these findings, we conducted further in vitro experiments to explore the miRNA regulatory effect on the *RORA* gene in the 22Rv1 PCa cell line. This cell line was chosen to accurately replicate the effects of the

PPAT-EVs within a relevant biological context, as all our PPAT samples originate from androgen-sensitive tumours, and 22Rv1 cells derive from a primary prostate tumour and possess the androgen receptor. Using inhibitors of two deregulated miRNAs (hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106b-5p), we observed an increase in mRNA and protein levels of RORA in the androgen-sensitive 22Rv1 PCa cell line. Additionally, we observed a reduction in cell viability of the 22Rv1 cell line when using the hsa-miR-20a-5p inhibitor (i20a-5p). This reduction was partially rescued when the *RORA* gene was silenced, indicating that *RORA* gene expression is epigenetically regulated by hsa-miR-20a-5p, thus reducing the proliferative capacity of tumour cells. The involvement of the *RORA* gene in proliferation was further evidenced by the up-regulation of hsa-miR-1290 in PCa cell lines [39].

RORA gene expression has been associated with decreased proliferation and invasion because it inhibits the Wnt/ β -catenin pathway, preventing the transformation and progression of some types of cancer, such as breast cancer [31] and negatively regulates genes such as c-jun, c-myc and cyclin D1 [36]. *RORA*'s pathway action can be through direct binding to DNA: canonical pathway; or by coupling to other molecules involved in the Wnt or p53 pathway: a non-canonical pathway [31, 40]. *ROR α* 1 variant has been demonstrated to have anti-proliferative activity, also affecting cell cycle progression in the DU145 androgen-dependent PCa cell line (by modulating p21 and cyclin A) as well as inhibiting the conversion of fatty acids into 5- α -Hydroxyeicosatetraenoic acid (responsible for the proliferative effect) [41].

RORA has been described as a negative regulator of the inflammatory response in several processes [42–44]. Thus, *RORA* expression has also been associated with anti-inflammatory capacity in primary human aortic cells [44] a finding consistent with the fact that its deletion confers pro-inflammatory characteristics by polarizing macrophages to M1 type [31, 42]. Moreover, *RORA* has been shown to decrease inflammation in breast cancer cells by inhibiting reactive oxygen species-mediated cytokine expression [45]. However, the better-known pathway by which *RORA* negatively regulates the inflammatory processes is via NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B Subunit 1) signalling pathway, involving the inhibition of TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) [46, 47]. In the PCa context, we found that hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106b-5p may reduce inflammation by targeting *RORA* gene through regulation of TNF- α expression. In fact, we demonstrated that *RORA* gene silencing increases TNF- α gene expression, pointing out that *RORA* is regulating TNF- α gene expression. Interestingly, when hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106b-5p were inhibited, TNF- α gene expression was decreased, indicating that both miRNAs were involved in TNF- α gene regulation. However, only

simultaneous co-inhibition of the hsa-miR-20a-5p and siRORA gene rescued TNF- α gene expression. Thus, this finding is in concordance with those observed in proliferation, suggesting for the first time to our knowledge that hsa-miR-20a-5p is involved in regulating proliferation and inflammation through targeting *RORA* gene in the 22Rv1 PCa cell line.

Conclusions

We have identified deregulated miRNAs contained in EVs secreted by PPAT that target *RORA* gene, which has a role in the proliferation and inflammation of PCa cells, reinforcing the implications of PPAT in PCa aggressiveness, and revealing its potential for the development of new therapeutic strategies.

Abbreviations

ARNTL	Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1
AT	Adipose Tissue
BATF	Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor
BCL6	BCL6 Transcription Repressor
BCL-X1	B-cell lymphoma extra-large
CCL7	C-C Motif Chemokine Ligand 7
CCR3	CCL7 Chemokine Receptor
CCK-8	Cell Counting Kit
CEIm	Ethical Committee for Clinical Research
CLOCK	Clock Circadian Regulator
CT	Cycle Threshold
DA2	Design and Analysis Software v2.6.0
DCTX	Docetaxel
FBS	Foetal Bovine Serum
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
EVs	Exovesicles
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
IL-6	Interleukin 6
iNC	Negative control A miRCURY LNA miRNA Power Inhibitor Control
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
ISUP	International Society of Urological Pathology
i20a-5p	hsa-miR-20a-5p miRCURY LNA miRNA Power Inhibitor
i106b-5p	hsa-miR-106b-5p miRCURY LNA miRNA Power Inhibitor
LogitProb	Logistic probability of binding
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
mRNA	messenger RNA
NPAS2	Neuronal PAS Domain Protein 2
NR1F1	nuclear receptor subfamily 1, group F, member 1
NPP	Non-Pathogenic Prostate
NRIP1	Nuclear Receptor Interacting Protein 1
KAT5	Lysine Acetyltransferase 5
PCa	Prostate Cancer
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase chain reaction
PPAT	Periprostatic adipose tissue
PPAT-EVs	PPAT-derived exovesicles
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PRAD	Prostate Adenocarcinoma
PTT	Prostate Tumour Tissue
PVAT	Perivesical adipose tissue
PVAT-EVs	PVAT-derived exovesicles
RORA	RAR Related Orphan Receptor A gene
siNC	Silencer*Select Negative Control siRNA
SEM	Standard error of the mean
siRORA	Silencer Select Pre-designed siRNA RORA
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF α	Transforming Growth Factor Alpha
TEM	Transmission Electron Microscopy

TME	Tumour Microenvironment
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TUBB2B	β -tubulin isoform 2B
TWIST1	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
UTR	Untranslated region
ZNF134	Zinc Finger Protein 134
ZNF217	Zinc Finger Protein 217
ZNF264	Zinc Finger Protein 264

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05458-3>.

Supplementary Material 1
Supplementary Material 2
Supplementary Material 3
Supplementary Material 4
Supplementary Material 5
Supplementary Material 6
Supplementary Material 7
Supplementary Material 8
Supplementary Material 9

Acknowledgements

We wish to 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 & PT13/0010/0062) for its collaboration.

Author contributions

All authors read and approved the final manuscript. Conceptualization: M.R.CH, A A-C, X. R-P and S. S-M. Adipose tissue collection: S. S-M and V. A-G. Clinic pathological patient information X R-P, J. S-T, X. B.-E, H A-T and JF G-F. Formal analysis: M.R.CH, A. A-C, S. S-M, X. R-P and V. A-G. Writing, review, and editing: M.R.CH, X. R-P, J. S-T, S. S-M, A A-C, and V. A-G. Funding acquisition: M.R.CH and X. R-P

Funding

This study was founded by Grants from "Instituto de Salud Carlos III" through projects (PI17/00877, PI20/00418; PI24/00015) and co-funded by the European Union. By a grant from Spanish Ministry of Science and Innovation (MCIN/AEI/ <https://doi.org/10.13039/501100011033> (PID2023-146128OB-I00) and by the European Regional Development Fund (ERDF), "ERDF, A way of making Europe". By funds from AECC (Asociación Española Contra el cancer) PROJECT N^o PRYES246650RODR. Silvia Sánchez-Martin was supported by a grant from "Departament de Salut - SLT017/20/000019" Personal investigador en formació (PIF-Salut) from "Programa d'impuls del talent i de l'ocupabilitat del PERIS 2016–2020". Veronica Arreaza-Gil was founded by an INVESTIGO contract 2022 INV-100036ID1 from AGAUR (Agencia de Gestió de Ayudas Universitaries y de Investigación), within framework of the Recovery, Transformation and Resilience Plan - Financed by the European Union – Next Generation EU. No payment has been received to write this article by a pharmaceutical company or other agency.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this article, and its additional information files. The datasets underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

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; Ref. CEIM205/2020). All participants provided written consent before starting the study.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Disease Biomarkers and Molecular Mechanisms Group. IISPV. Joan, XXIII University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

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

³Pathology Unit, Joan XXIII University Hospital, Tarragona, Spain

⁴Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili. Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, C/ Dr. Mallafre Guasch, 4, Tarragona 43007, Spain

Received: 2 May 2024 / Accepted: 29 June 2024

Published online: 15 July 2024

References

- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74:229–63.
- Wang L, Lu B, He M, Wang Y, Wang Z, Du L. Prostate Cancer incidence and mortality: global status and temporal trends in 89 countries from 2000 to 2019. *Front Public Health*. 2022;10:811044.
- Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, et al. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7:9.
- Mansinho A, Macedo D, Fernandes I, Costa L. Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1096:117–33.
- Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020;30:R921–25.
- Lo Iacono M, Modica C, Porcelli G, Brancato OR, Muratore G, Bianca P, et al. Targeting of the peritumoral adipose tissue microenvironment as an innovative antitumor therapeutic strategy. *Biomolecules*. 2022;12:702.
- Woo S, Cho JY, Kim SY, Kim SH. Periprostatic fat thickness on MRI: correlation with Gleason score in prostate cancer. *AJR Am J Roentgenol*. 2015;204:W43–7.
- Bhindi B, Trottier G, Elharram M, Fernandes KA, Lockwood G, Toi A, et al. Measurement of peri-prostatic fat thickness using transrectal ultrasonography (TRUS): a new risk factor for prostate cancer. *BJU Int*. 2012;110:980–6.
- Ribeiro R, Monteiro C, Cunha V, Oliveira MJ, Freitas M, Fraga A. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31:32.
- Laurent V, Gue A, Nieto L, Zaidi F, Majed B, Garandeau D, et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat Commun*. 2016;7:1–15.
- Zhang Q, Sun L, Jiang, Yang Z gang, Zhang G. ming, Huo R cha. Influence of adipocytokines in periprostatic adipose tissue on prostate cancer aggressiveness. *Cytokine*. 2016;85:148–56.
- la Civita E, Liotti A, Cennamo M, Crocetto F, Ferro M, Liguoro P, et al. Periprostatic adipocyte-released tgfb enhances prostate cancer cell motility by upregulation of connective tissue growth factor. *Biomedicine*. 2021;9:1692.
- Estève D, Roumigué M, Manceau C, Milhas D, Muller C. Periprostatic adipose tissue: a heavy player in prostate cancer progression. *Curr Opin Endocr Metab Res*. 2020;10:29–35.
- Liotti A, La Civita E, Cennamo M, Crocetto F, Ferro M, Guadagno E, et al. Periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer resistance to docetaxel by paracrine IGF-1 upregulation of TUBB2B beta-tubulin isoform. *Prostate*. 2021;81:407–17.
- Altuna-Coy A, Ruiz-Plazas X, Sánchez-Martin S, Ascaso-Til H, Prados-Saavedra M, Alves-Santiago M, et al. The lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue reveals alterations in tumor cell's metabolic crosstalk. *BMC Med*. 2022;20:255.

16. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:1–60.
17. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024;13:e12404.
18. Vanacore D, Boccellino M, Rossetti S, Cavaliere C, Daniello C, Di Franco R, et al. Micromas in prostate cancer: an overview. *Oncotarget*. 2017;8:50240–51.
19. Lazar I, Clement E, Dauvillier S, Milhas D, Ducoux-Petit M, LeGonidec S, et al. Adipocyte exosomes promote Melanoma aggressiveness through fatty acid oxidation: a novel mechanism linking obesity and cancer. *Cancer Res*. 2016;76:4051–7.
20. Jeurissen S, Vergauwen G, Van Deun J, Lapeire L, Depoorter V, Minalainen I, et al. The isolation of morphologically intact and biologically active extracellular vesicles from the secretome of cancer-associated adipose tissue. *Cell Adh Migr*. 2017;11:196–204.
21. Gernapudi R, Yao Y, Zhang Y, Wolfson B, Roy S, Duru N, et al. Targeting exosomes from preadipocytes inhibits preadipocyte to cancer stem cell signaling in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;150:685–95.
22. Reza AMMT, Choi YJ, Yasuda H, Kim JH. Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti-proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells. *Sci Rep*. 2016;6:38498.
23. 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;40:244–52.
24. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn ilip, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3.
25. Rennie W, Liu C, Carmack CS, Wolenc A, Kanoria S, Lu J, et al. STarMir: a web server for prediction of microRNA binding sites. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:114–8.
26. Agell L, Hernández S, Nonell L, Lorenzo M, Puigdecanet E, De Muga S, et al. A 12-gene expression signature is associated with aggressive histological in prostate cancer: SEC14L1 and TCEB1 genes are potential markers of progression. *Am J Pathol*. 2012;181:1585–94.
27. 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;12:245–55.
28. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest*. 2016;126:1208–15.
29. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913.
30. Liu S, Benito-Martin A, Pelissier Vatter FA, Hanif SZ, Liu C, Bhardwaj P, et al. Breast adipose tissue-derived extracellular vesicles from obese women alter tumor cell metabolism. *EMBO Rep*. 2023;24:e57339.
31. Lee JM, Kim H, Baek SH. Unraveling the physiological roles of retinoic acid receptor-related orphan receptor α . *Exp Mol Med*. 2021;53:1278–86.
32. Sakellakis M. Orphan receptors in prostate cancer. *Prostate*. 2022;82:1016–24.
33. Benna C, Helfrich-Förster C, Rajendran S, Monticelli H, Pilati P, Nitti D, et al. Genetic variation of clock genes and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:23978–95.
34. Kallen JA, Schlaeppi J-M, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, et al. X-Ray structure of the hROR α LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of ROR α . *Structure*. 2002;10(12):1697–707.
35. Roshan-Moniri M, Hsing M, Butler MS, Cherkasov A, Rennie PS. Orphan nuclear receptors as drug targets for the treatment of prostate and breast cancers. *Cancer Treat Rev*. 2014;40:1137–52.
36. Park SC, Park IG, Kim H, Lee JM. N-terminal domain mediated regulation of ROR α 1 inhibits invasive growth in prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1684.
37. Matsuoka H, Michihara A. Identification of the rora transcriptional network contributes to the search for therapeutic targets in atherosclerosis. *Biol Pharm Bull*. 2021;44:1607–16.
38. Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R, Smith DI. RORA, a large common fragile site gene, is involved in cellular stress response. *Oncogene*. 2006;25:2901–8.
39. Li Y, He J, Yu L, Yang Q, Du J, Chen Y, et al. Hsa-miR-1290 is associated with stemness and invasiveness in prostate cancer cell lines by targeting RORA. *Andrologia*. 2022;54:e14396.
40. Du J, Xu R. ROR α , a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13:15755–66.
41. Moretti RM, Montagnani Marelli M, Sala A, Motta M, Limonta P. Activation of the orphan nuclear receptor ROR α counteracts the proliferative effect of fatty acids on prostate cancer cells: crucial role of 5-lipoxygenase. *Int J Cancer*. 2004;112:87–93.
42. Nejati Moharrami N, Tande EB, Ryan L, Espevik T, Boyartchuk V. ROR α controls inflammatory state of human macrophages. *PLoS ONE*. 2018;13:e0207374.
43. Oh SK, Kim D, Kim K, Boo K, Yu YS, Kim IS, et al. ROR α is crucial for attenuated inflammatory response to maintain intestinal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116:21140–9.
44. Delerive P, Monté D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, et al. The orphan nuclear receptor ROR α is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep*. 2001;2:42–8.
45. Mao W, Xiong G, Wu Y, Wang C, Clair DS, Li JD, et al. ROR α suppresses cancer-associated inflammation by repressing respiratory complex I-dependent ROS generation. *Int J Mol Sci*. 2021;22:10665.
46. Han S, Li Z, Han F, Jia Y, Qi L, Wu G, et al. ROR α protects against LPS-induced inflammation by down-regulating SIRT1/NF- κ B pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2019;668:1–8.
47. Jiang Y, Zhou J, Zhao J, Hou D, Zhang H, Li L, et al. MiR-18a downregulated ROR α inhibits the proliferation and tumorigenesis of glioma using the TNF- α -mediated NF- κ B signaling pathway. *EBioMedicine*. 2020;52:102651.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Table S1. Anthropometric and clinical characteristics (according to ISUP-GG criteria) of the pilot study patient's:

Patient's Characteristics	Median (Range)	N		
Anthropometric parameters				
Age (years)	67.00 (61.50, 71.75)	4		
BMI (Kg/m ²)	24.35 (23.51, 25.50)	4		
Prostatic volume (cc)	41.25 (28.63, 110.50)	4		
Glycemic profile				
Glucose (mmol/L)	5.17 (4.18, 5.81)	4		
Insulin (pmol/L)	53.96 (44.24, 107.23)	4		
HOMA-IR	1.82 (1.26, 3.74)	4		
Lipid profile				
Cholesterol Total (mmol/L)	4.80 (5.58, 6.86)	4		
HDL Cholesterol (mmol/L)	1.18 (1.10, 1.45)	4		
LDL Cholesterol (mmol/L)	3.15 (2.39, 4.79)	4		
Triglycerides (mmol/L)	1.49 (1.09, 2.19)	4		
Hepatic profile				
AST (μkat/L)	0.45 (0.28, 0.52)	4		
ALT (μkat/L)	0.36 (0.25, 0.45)	4		
GGT (μkat/L)	0.43 (0.31, 0.52)	4		
Renal profile				
Uric acid (μmol/L)	379.56 (326.27, 412.79)	4		
Urea (mmol/L)	11.61 (6.70, 19.30)	4		
Creatinine (μmol/L)	91.50 (81.77, 95.25)	4		
Hormonal profile				
SHBG (nmol/l)	48.70 (32.40, 56.80)	4		
Testosterone (nmol/l)	17.90 (11.68, 32.44)	4		
Tumoral markers				
Total PSA (ng/mL)	12.74 (6.35, 18.90)	4		
dPSA	0.25 (0.16, 0.32)	4		
ISUP-GG				
Low Risk	Group I	0	0	0
	Group II	0	0	0
High Risk	Group III	2	2	2
	Group IV	2	2	2
	Group V	0	0	0
T pathological stage	≤T2a	1	n=4	n=4
	T3,T4	3		
N pathological stage	NX	2		
	N0	1		
	N1	1		

Abbreviations: BMI, body mass index; cc, centiliters; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma glutamyltransferase; SHBG, sex hormone-binding globulin; PSA, prostate specific antigen; dPSA, PSA density; PPAT, periprostatic adipose tissue; PVAT, perivesical adipose tissue; 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); T stage, Tumor category; N stage, Node category.

Table S2. Anthropometric and clinical characteristics (according to ISUP-GG criteria) of patients used in the validation study.

Patient's Stratification	ISUP GG Classification		p-Value
	Low Risk	High Risk	
	(Group I and II)	(Group III, IV and V)	
	N=14	N=11	
	Median (Range)	Median (Range)	
Anthropometric parameters			
Age (years)	66.00 (58.50, 71.25)	64.50 (60.00, 68.50)	0.814
BMI (kg/m ²)	25.46 (24.31, 30.62)	28.98 (25.94, 29.56)	0.319
Prostatic volume (cc)	45.00 (26.50, 67.50)	46.50 (35.00, 66.50)	0.598
Glycaemic profile			
Glucose (mmol/L)	5.61 (4.66, 6.70)	5.05 (4.80, 5.97)	0.504
Insulin (pmol/L)	84.10 (65.63, 102.54)	62.09 (49.10, 125.40)	0.650
HOMA-IR	3.27 (2.05, 3.77)	1.82 (1.38, 3.78)	0.414
Lipid profile			
Cholesterol (mmol/L)	5.38 (4.63, 5.54)	6.14 (4.54, 6.44)	0.290
HDL cholesterol (mmol/L)	1.37 (1.14, 1.50)	1.40 (1.13, 1.72)	0.751
LDL cholesterol (mmol/L)	3.05 (2.57, 3.86)	4.13 (2.68, 4.53)	0.260
Triglycerides (mmol/L)	1.06 (0.90, 2.46)	1.25 (1.06, 1.82)	0.396
Hepatic profile			
AST (μ kat/L)	0.40 (0.32, 0.52)	0.36 (0.30, 0.42)	0.216
ALT (μ kat/L)	0.43 (0.35, 0.80)	0.38 (0.32, 0.48)	0.217
GGT (μ kat/L)	0.45 (0.32, 1.30)	0.48 (0.33, 0.90)	0.916
Renal profile			
Uric acid (μ mol/L)	309.32 (267.10, 382.00)	365.53 (343.25, 405.12)	0.139
Urea (mmol/L)	6.33 (4.91, 11.40)	7.08 (6.10, 10.81)	0.396
Creatinine (μ mol/L)	79.65 (68.95, 89.73)	86.63 (72.93, 94.81)	0.203
Hormonal profile			
SHBG (nmol/L)	56.80 (35.60, 60.40)	40.50 (37.75, 50.73)	0.347
Testosterone (nmol/L)	15.42 (11.39, 21.60)	16.45 (13.84, 21.59)	0.623
Tumoral marker			
Total PSA (μ g/L)	6.59 (4.85, 7.64)	8.13 (5.72, 10.23)	0.198
dPSA	0.18 (0.08, 0.26)	0.16 (0.13, 0.19)	0.709

ISUP-GG		N	PPAT	PVAT
Low Risk	Group I	4	4	4
	Group II	10	10	5
High Risk	Group III	8	8	5
	Group IV	2	2	2
	Group V	1	0	1
T pathological stage	≤T2a	15		
	T3,T4	10		
N pathological stage	NX	19		
	N0	4		
	N1	2		

Abbreviations: BMI, body mass index; cc, centiliters; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma glutamyltransferase; SHBG, sex hormone-binding globulin; PSA, prostate-specific antigen; dPSA, PSA density; PPAT, periprostatic adipose tissue; PVAT, perivesical adipose tissue; 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); T stage, Tumor category; N stage, Node category.

Table S3. Anthropometric and clinical characteristics of the CancerMIRNome patient's database

Patient's Characteristics		
Anthropometric parameters	Median (Range)	N
Age (years)	60.29 (43.00, 72.00)	52
ISUP-GG		
Low Risk	Group I	5
	Group II	25
High Risk	Group III	15
	Group IV	3
	Group V	4
T pathological stage	≤T2a	29
	T3,T4	23
N pathological stage	NX	5
	N0	46
	N1	1

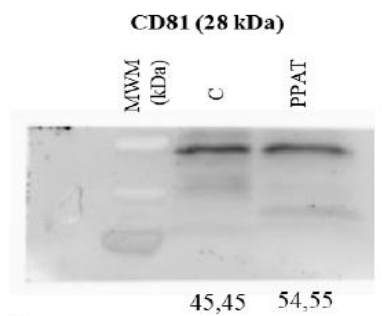
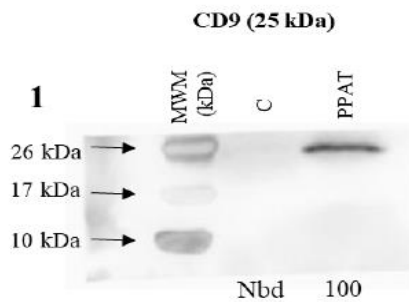
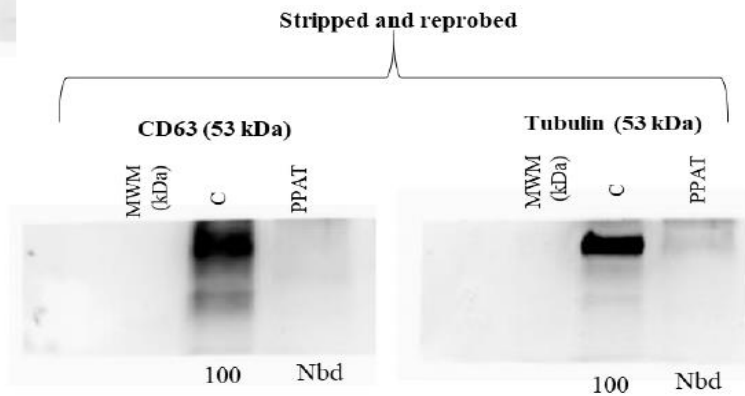
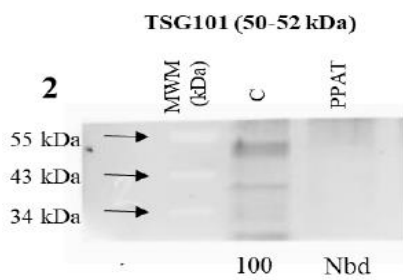
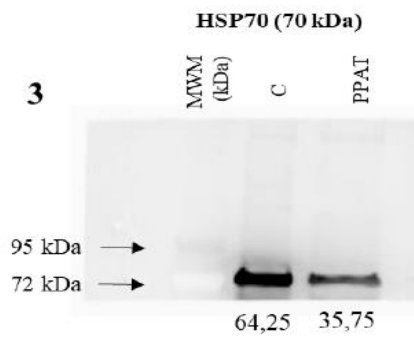
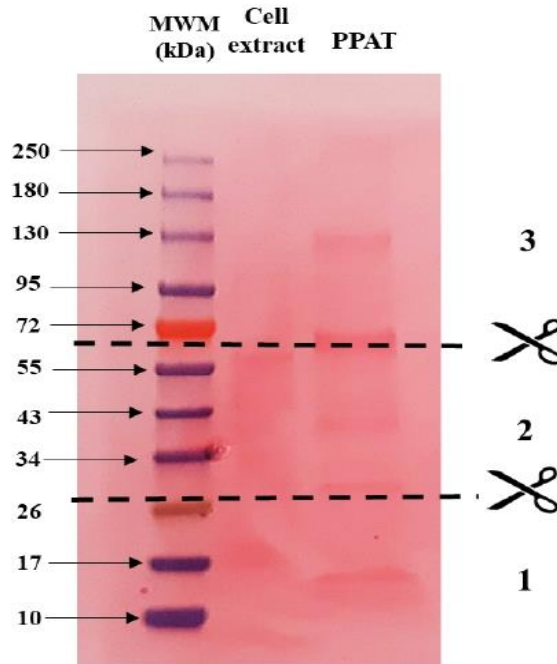
Abbreviations: ISUP-GG, International Society of Urological Pathology Gleason Grade groups based on the Gleason score as follows: (Gleason score ≤ 6 - Group I; 3 + 4 = 7 - Group II; 4 + 3 = 7 - Group III; 4 + 4 = 8 - Group IV; and 9-10-Group V); T stage, Tumor category; N stage, Node category.

Table S4. Anthropometric and clinical characteristics (according to ISUP-GG criteria) of patients used in the paraffin study.

Patient's Stratification	ISUP GG Classification		<i>p</i> -Value
	Low Risk	High Risk	
	(Group I and II)	(Group III, IV and V)	
	N=18	N=14	
	Median (Range)	Median (Range)	
Anthropometric parameters			
Age (years)	67.5 (62.72, 69.75)	67.00 (63.50, 70.50)	0.877
BMI (kg/m ²)	27.03 (25.50, 28.85)	27.34 (25.77, 29.65)	1.000
Prostatic volume (cc)	54.00 (29.75, 80.25)	46.00 (38.25, 60.50)	0.644
Glycaemic profile			
Glucose (mmol/L)	5.75 (4.83, 6.87)	5.80 (4.96, 6.12)	0.777
Insulin (pmol/L)	63.48 (50.60, 75.80)	75.08 (63.74, 99.11)	0.080
HOMA-IR	2.23 (1.74, 3.43)	2.78 (2.12, 3.86)	0.237
Lipid profile			
Cholesterol (mmol/L)	5.09 (4.40, 5.39)	5.03 (4.49, 5.79)	0.681
HDL cholesterol (mmol/L)	1.53 (1.18, 1.67)	1.49 (1.23, 1.69)	0.520
LDL cholesterol (mmol/L)	3.09 (2.51, 3.34)	3.03 (2.50, 3.58)	0.959
Triglycerides (mmol/L)	1.05 (0.73, 1.73)	1.17 (0.89, 1.53)	0.589
Tumoral marker			
Total PSA (µg/L)	5.60 (4.68, 7.08)	6.59 (5.36, 10.86)	0.341
dPSA	0.16 (0.09, 0.19)	0.16 (0.10, 0.26)	0.446

ISUP-GG		N
Low Risk	Group I	18
	Group II	0
High Risk	Group III	6
	Group IV	6
	Group V	2
T pathological stage	≤T2a	32
	T3, T4	0
N pathological stage	NX	21
	N0	11
	N1	0

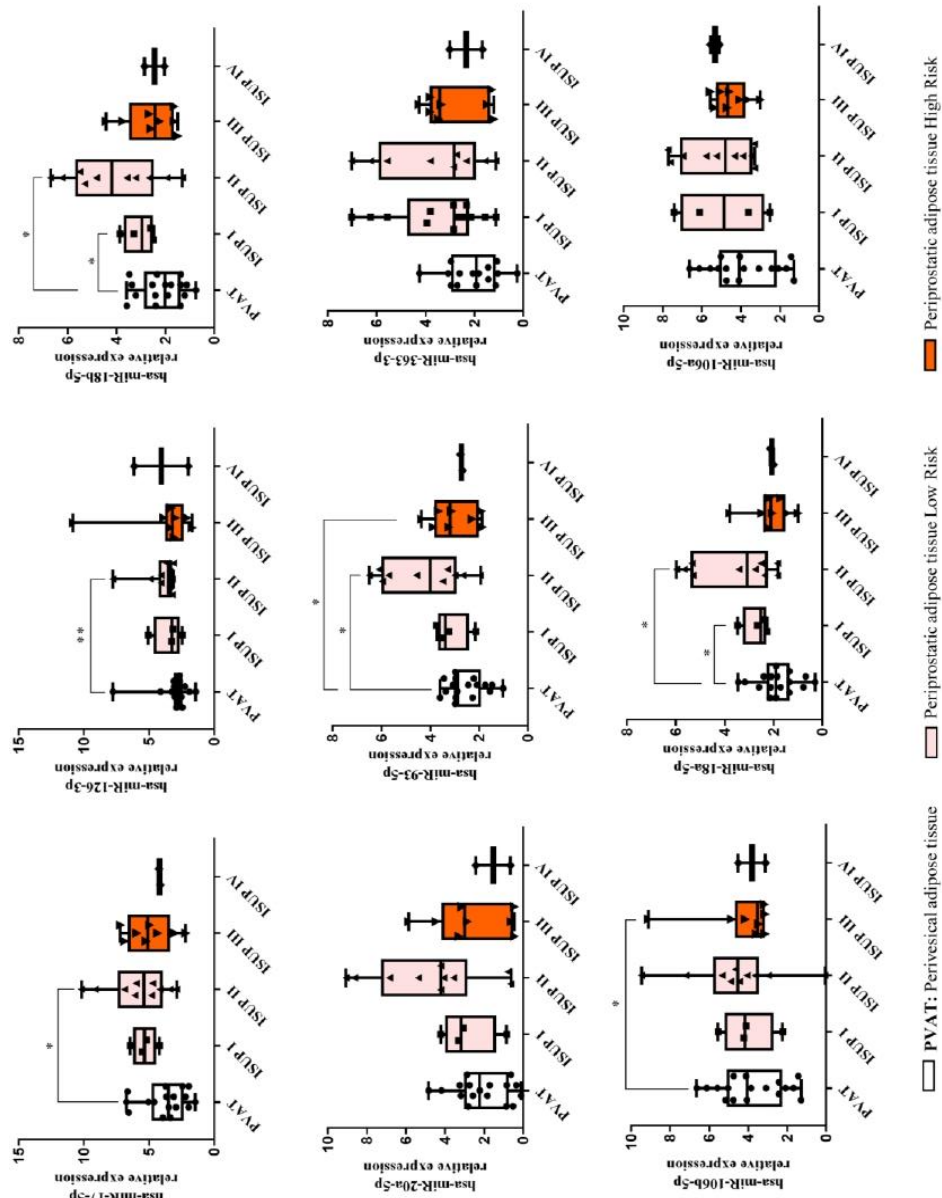
Abbreviations: BMI, body mass index; cc, centiliters; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; PSA, prostate specific antigen; dPSA, PSA density; ISUP-GG, International Society of Urological Pathology Gleason Grade groups 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); T stage, Tumor category; N stage, Node category.



Stripped and reprobed

Additional File 2: Figure S1. Complete Western Blot results referring to **Figure 1**. Ponceau stained images of gel-transferred membranes cut before antibody incubation to allow detection of CD9, TSG101, HSP70 proteins (1,2,3). Then stripping off was performed and membranes were reprobed with CD63, CD81, and Tubulin antibodies (1 and 2). The numbers below the membranes represent the percentage of intensity.

Legend: C: Cell extract, Nbd: no band detected.



Additional File 4: Figure S2. Representation of the 9 discriminatory miRNAs in PVAT-EVs compared to PVAT-EVs segregated according to ISUP. Box plots showing median, quartiles, and extreme values of relative expression of discriminatory miRNAs. Symbols: * indicates significant differences, * p -value <0.05 ; ** p -value <0.001 .

FUNCTIONS	PROTEINS
<p>Cancer transformation and progression</p> <p>Regulation of RORA activity that attenuates the canonical Wnt pathway involved in cancer transformation and progression</p>	<p>WNT5A Wnt Family Member 5A</p>
<p>Cell growth</p> <p>Activation of transcriptional programs associated with oncogene and proto-oncogene mediated growth induction, tumor suppressor mediated growth arrest and replicative senescence, apoptosis and DNA repair</p>	<p>KAT5 Lysine Acetyltransferase 5</p>
<p>Mediation cellular responses to interleukins and other growth factors</p>	<p>STAT3 Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</p>
<p>Differentiation, inflammation and apoptosis</p> <p>Repression the transcriptional expression of genes involved in differentiation, inflammation, apoptosis etc...</p>	<p>BCL-6 Transcription Repressor</p>
<p>T cell differentiation</p> <p>Transcription factor that mediates the differentiation of different T-cell type</p>	<p>BATF Basic Leucine Zipper/ATF-Like Transcription Factor</p>
<p>Hypoxia, angiogenesis and tumor metastasis</p> <p>Transcriptional regulator of the adaptive response to hypoxia (involved in angiogenesis and tumor metastasis)</p>	<p>HIF1A Hypoxia-inducible factor 1-alpha</p>
<p>Circadian cycle</p> <p>ARTNL (CLOCK/NPAS2) forms BMAL1 heterodimer that transactivates the CRY and PER genes that are upregulated during the day but degraded at night (via phosphorylation and polyubiquitination). NR1D1 represses ARTNL transcription while RORA activates it. BMAL1;CLOCK and BMAL1;NPAS2 heterodimers activate a set of genes that have E-box elements in their promoters (this confers circadian expression to the genes)</p>	<p>ARNTL Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like</p> <p>NPAS2 Neuronal PAS Domain Protein 2</p> <p>CLOCK Clock Circadian Regulator</p>
<p>RORA co-activator. Positive regulator of circadian cycles</p>	<p>NRIP1 Nuclear Receptor Interacting Protein 1</p>

Additional File 5: Figure S3. Table summarizing the function of the putative proteins interacting with genes resulting from the RORA STRING analysis (the colours of the protein name correspond to its corresponding node site at the STRING network in **Figure 3**).

RORA variant 1

miRNA	Site Position	LogitProb
hsa-miR-18b-5p	2473-2499	0,822
hsa-miR-93-5p	2463-2486	0,805
hsa-miR-17-5p	2463-2486	0,800
hsa-miR-106a-5p	2463-2486	0,800
hsa-miR-20a-5p	2463-2486	0,779
hsa-miR-106b-5p	2464-2486	0,779
hsa-miR-18a-5p	2464-2499	0,756
hsa-miR-17-5p	1893-1905	0,670
hsa-miR-106a-5p	1893-1905	0,670
hsa-miR-20a-5p	1893-1906	0,648
hsa-miR-20a-5p	1836-1847	0,616
hsa-miR-106b-5p	1897-1906	0,560
hsa-miR-93-5p	1863-1905	0,490
hsa-miR-126-3p	2574-2587	0,439
hsa-miR-93-5p	3718-3744	0,304
hsa-miR-17-5p	3718-3744	0,263
hsa-miR-20a-5p	3718-3744	0,263
hsa-miR-106a-5p	3718-3744	0,263
hsa-miR-106b-5p	3726-3744	0,253

RORA variant 2

miRNA	Site Position	LogitProb
hsa-miR-18b-5p	2473-2499	0,821
hsa-miR-93-5p	2463-2486	0,802
hsa-miR-106a-5p	2463-2486	0,799
hsa-miR-17-5p	2463-2486	0,799
hsa-miR-106b-5p	2464-2486	0,778
hsa-miR-20a-5p	2463-2486	0,778
hsa-miR-18a-5p	2464-2499	0,753
hsa-miR-106a-5p	1893-1905	0,663
hsa-miR-17-5p	1893-1905	0,663
hsa-miR-20a-5p	1893-1906	0,642
hsa-miR-20a-5p	1836-1847	0,638
hsa-miR-106b-5p	1897-1906	0,555
hsa-miR-93-5p	1863-1905	0,493
hsa-miR-126-3p	2574-2587	0,441
hsa-miR-93-5p	3718-3744	0,300
hsa-miR-106a-5p	3718-3744	0,261
hsa-miR-20a-5p	3718-3744	0,261
hsa-miR-17-5p	3718-3744	0,261
hsa-miR-106b-5p	3726-3744	0,251

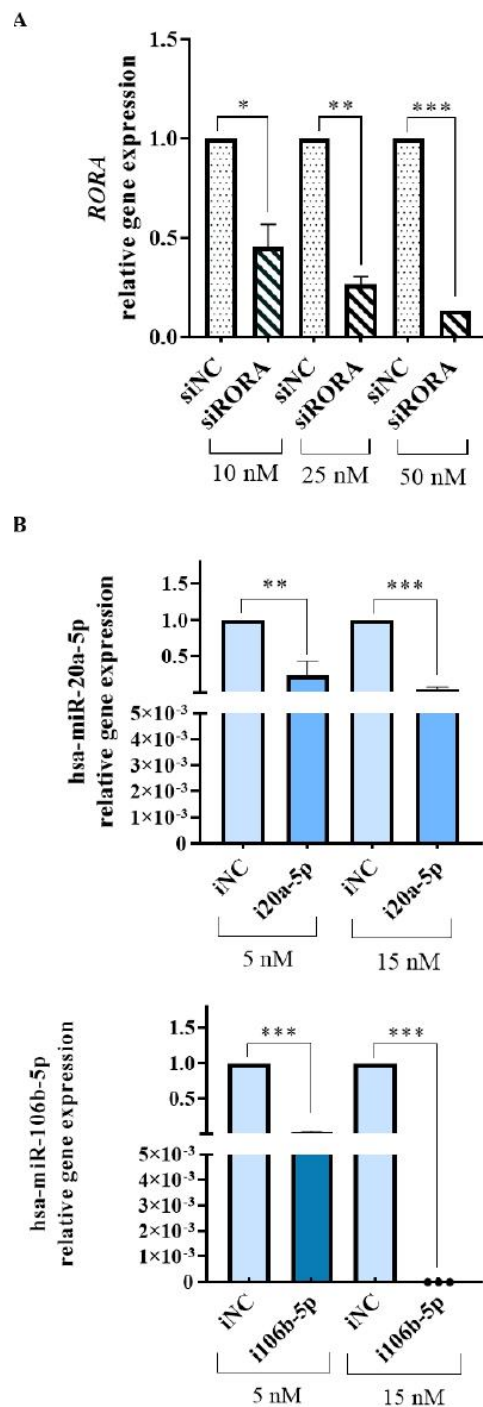
RORA variant 3

miRNA	Site Position	LogitProb
hsa-miR-18b-5p	2449-2475	0,822
hsa-miR-93-5p	2439-2462	0,802
hsa-miR-17-5p	2439-2462	0,798
hsa-miR-106a-5p	2439-2462	0,798
hsa-miR-20a-5p	2439-2462	0,777
hsa-miR-106b-5p	2440-2462	0,775
hsa-miR-18a-5p	2440-2475	0,750
hsa-miR-17-5p	1869-1881	0,672
hsa-miR-106a-5p	1869-1881	0,672
hsa-miR-20a-5p	1869-1882	0,650
hsa-miR-20a-5p	1812-1823	0,618
hsa-miR-106b-5p	1873-1882	0,560
hsa-miR-93-5p	1839-1881	0,489
hsa-miR-126-3p	2550-2563	0,440
hsa-miR-93-5p	3694-3720	0,304
hsa-miR-17-5p	3694-3720	0,261
hsa-miR-20a-5p	3694-3720	0,261
hsa-miR-106a-5p	3694-3720	0,261
hsa-miR-106b-5p	3702-3720	0,250

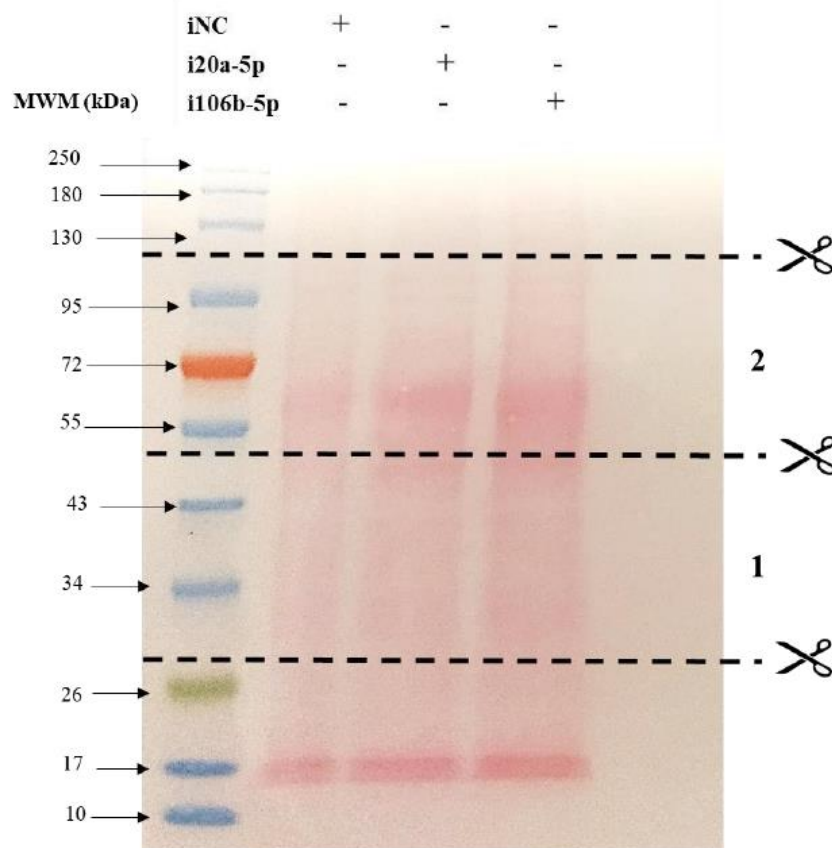
RORA variant 4

miRNA	Site Position	LogitProb
hsa-miR-18b-5p	2162-2188	0,824
hsa-miR-93-5p	2152-2175	0,805
hsa-miR-17-5p	2152-2175	0,798
hsa-miR-106a-5p	2152-2175	0,798
hsa-miR-20a-5p	2152-2175	0,777
hsa-miR-106b-5p	2153-2175	0,776
hsa-miR-18a-5p	2153-2188	0,753
hsa-miR-20a-5p	1525-1536	0,696
hsa-miR-17-5p	1582-1594	0,676
hsa-miR-106a-5p	1582-1594	0,676
hsa-miR-20a-5p	1582-1595	0,656
hsa-miR-106b-5p	1586-1595	0,564
hsa-miR-93-5p	1552-1594	0,444
hsa-miR-126-3p	2263-2276	0,443
hsa-miR-93-5p	3407-3433	0,312
hsa-miR-17-5p	3407-3433	0,272
hsa-miR-20a-5p	3407-3433	0,272
hsa-miR-106a-5p	3407-3433	0,272
hsa-miR-106b-5p	3415-3433	0,262

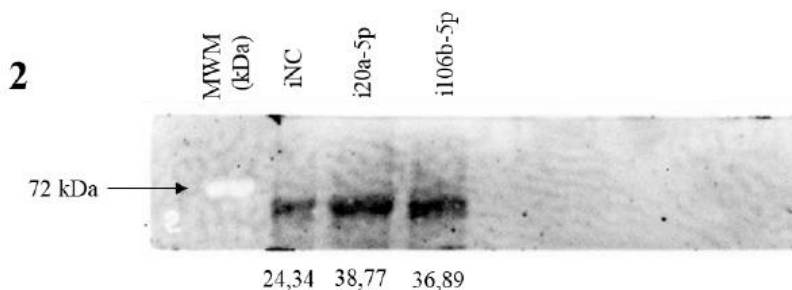
Additional File 6: Figure S4. Tables of all logistic probabilities of binding between miRNAs and each RORA variant are shown with the site position.



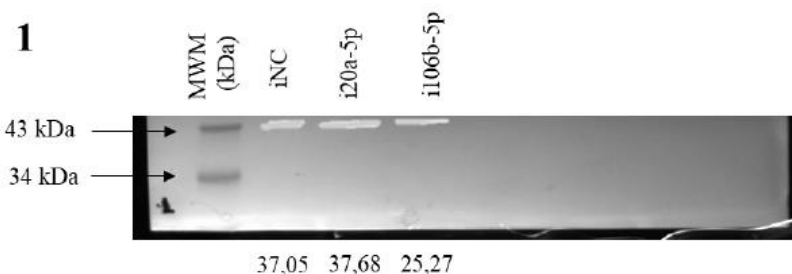
Additional File 7: Figure S5. A Dose response of siRORA in 22Rv1 cells at 24 hours: 10, 25, and 50 nM. Results are presented as relative expressions with mean and SEM of triplicate experiments. B Graph shows hsa-miR-20a-5p and hsa-miR-106b-5p expression after treating 22Rv1 cells with 5 and 15 nM of their respective inhibitors for 24 hours. Symbols: * indicates significant differences, *p-value<0.05; ** pvalue<0.01; ***p-value<0.001.



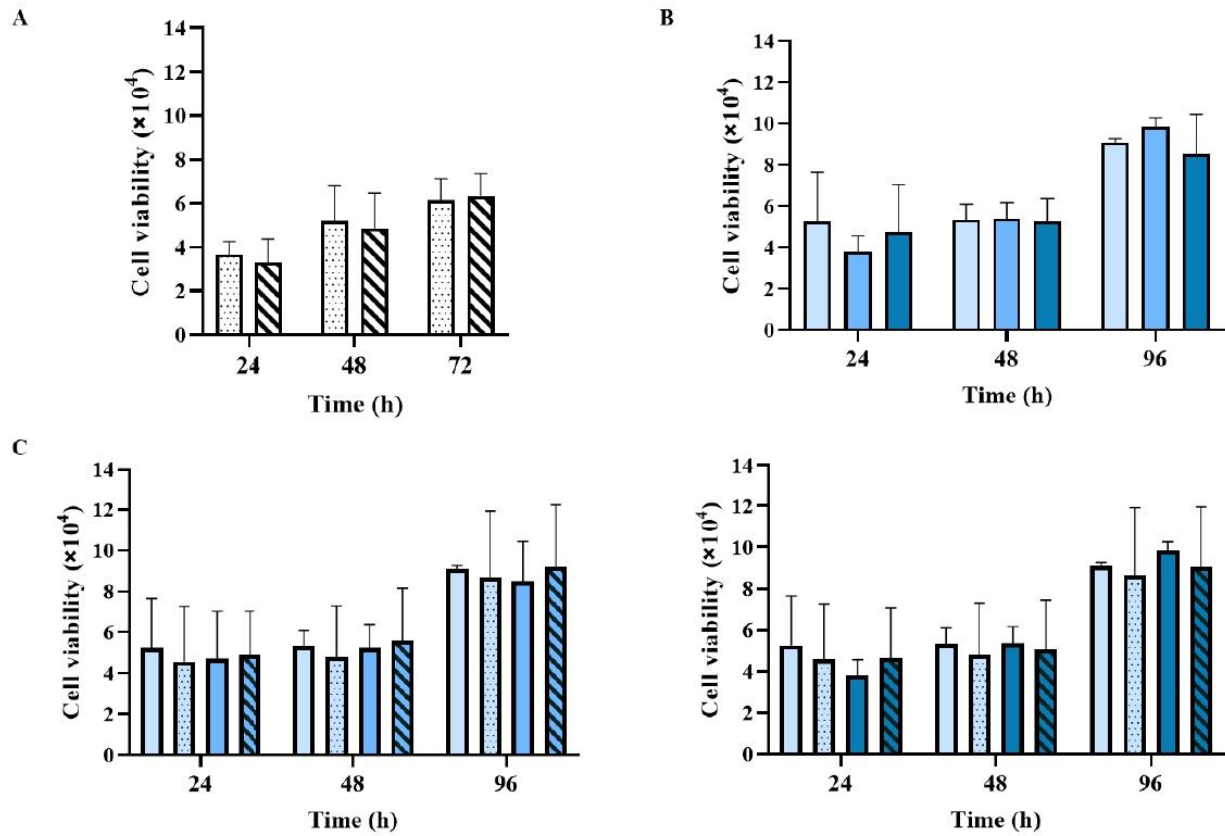
RORA (60kDa)



β-Actin (42 kDa)



Additional File 8: Figure S6. Complete Western blot result referring to Figure 5D. Ponceau stained images of gel transferred membranes cut before antibody incubation to allow detection of RORA and βActin proteins. The numbers below membranes represent the percentage of intensity.



Additional File 9: Figure S7. Cell Proliferation assays of 22Rv1 transfected with siRORA. A miR-20a-5p inhibitor (i20-1-5p) or miR-106b-5p inhibitor (i106b-5p). B or with the combination of each miRNA with siRNA RORA. C at different time points.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

IV. Discusión

El CaP es el segundo cáncer más frecuente en el mundo y la quinta causa de muerte por cáncer en los hombres (443). Según la OMS, una mayor incidencia del CaP se asocia con la raza (América del Norte, Europa, Oceanía y partes de África), la edad, la dieta y la genética entre otros. También influye en la detección temprana del tumor la implantación del PSA para cribado de CaP en suero a principios de los años 90 (1,2,6). Aparte de este parámetro, la clasificación TNM o el *Gleason Score* de la biopsia prostática son algunas de las pruebas más utilizadas para la caracterización tumoral y el tratamiento a seguir (28,30).

La principal problemática en el tratamiento del CaP es la incapacidad de distinguir entre tumores de crecimiento lento de los que suponen un riesgo vital para el paciente dado que no todos los pacientes con CaP presentan niveles elevados de PSA, y un aumento en los niveles de PSA puede tratarse de patologías benignas de la próstata (20). Esto conlleva sobrediagnósticos que comportan sobretratamientos a pacientes con tumores indolentes incluyendo cirugías, con los efectos secundarios asociados (22,23).

Por tanto, dada la alta incidencia de esta enfermedad y la considerable variabilidad indistinguible a veces desde casi benigno hasta potencialmente mortal, existe una necesidad urgente de encontrar nuevos biomarcadores que puedan ayudar a guiar a los médicos en la toma de decisiones con finalidad diagnóstica y/o pronóstica.

En la última década, el interés por el microambiente tumoral ha ido en aumento dada su contribución crucial en la progresión, la resistencia a fármacos y la agresividad en diversos tumores (122). Puesto que algunos tipos de cáncer se desarrollan en las proximidades del TA, el TAP ha recibido particular interés en tumores como el de hígado, ovario, páncreas, colon y mama (173). En el cáncer de mama, la invasión tumoral local temprana del TAP genera un encuentro probable entre las células cancerosas y los adipocitos maduros (444,445) que son reprogramados a CAA y secretan factores como adipoquinas, quimioquinas, citoquinas y factores de crecimiento que promueven la proliferación celular y la invasión del tumor y pueden afectar la respuesta a la terapia hormonal y dirigida (177,180–183,185,446). Es más, se ha descrito que el desarrollo del cáncer de mama no se da sin una previa infiltración en el TA de las células inmunes (126).

El cáncer de mama guarda similitud con el CaP hormonalmente hablando ya que pueden desarrollarse a partir de células que responden a estrógenos o testosterona respectivamente (126). En el caso de la próstata, el TA que rodea a este órgano se denomina TAPP. Este tejido puede contribuir activamente a la agresividad del CaP según estudios realizados en los que se han detectado factores liberados *in vitro* como adipoquinas, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y andrógenos entre otros y en su estado hipóxico, que se asocia con un estado inflamatorio crónico (164,211,212,214,215,217). Esta comunicación entre el TAPP y el CaP y que puede favorecer al tumor, puede agravarse en personas

obesas por modificaciones en el TAPP que contribuyen a una mayor agresividad incluyendo la recurrencia bioquímica después de la PR (245), la extensión extraprostática (215) y la metástasis ósea (243). Se ha descrito que la ubicación anatómica adyacente del TAPP hace que tenga más probabilidades de afectar la zona periférica de la próstata, pero es necesario investigar más a fondo si esto está relacionado con la mayor incidencia de CaP en esta zona (447).

Por lo ya expuesto, consideramos que abordar la interacción entre el TAPP y el CaP, puede ser esencial para obtener información que permita una detección temprana de la agresividad tumoral y desarrollar nuevos enfoques terapéuticos. Así pues, nuestra investigación se ha centrado en estudiar cómo el TAPP, como un componente del microambiente tumoral que se haya en contacto directo con el tumor, puede potenciar la agresividad del CaP mediante cambios en la reprogramación metabólica del tumor y la regulación epigenética de las células tumorales a través de exomiARNs contenidos en vesículas liberadas por este tejido.

Impacto metabólico del TAPP en la agresividad del CaP

Un primer enfoque de este estudio ha sido explorar el impacto que podría producirse en el metabolismo del CaP por la interacción de este con el TAPP que le rodea y su efecto sobre la agresividad del tumor.

La transformación maligna de las células supone adaptaciones que conllevan la desregulación de vías metabólicas que le proporciona la energía necesaria para su supervivencia, proliferación y metástasis en último término satisfaciendo cada una de las necesidades (78).

El metabolismo de un tumor depende de muchos factores, pero lo que es común en la mayoría de los tumores sólidos, es la rápida captación y metabolismo de la glucosa hacia vías no mitocondriales (el llamado efecto “Warburg”). Sin embargo, en el CaP, al menos en las primeras etapas, no encontramos este fenómeno, sino que lo distintivo es la producción de altas dosis de citrato mantenidas por la captación y uso de metabolitos exógenos como el piruvato para procesos biosintéticos como la lipogénesis (80,85). Además, se produce una gran captación y almacenamiento, elongación (por las desaturasas y/o elongasas) y una constante lipólisis (por lipasas citosólicas principalmente en el proceso de la β -oxidación) de AG (79,86,87,112). En este sentido, es lógico esperar, tal y como se ha reportado, una sobreexpresión de las enzimas implicadas en todos estos procesos lipídicos (91,98,99,101,106,107,111). Esta necesidad lipídica por parte de las células de CaP puede satisfacerse por absorción de lípidos en la circulación sanguínea (45) o de los que provienen de los adipocitos estromales (células madre mesenquimales del TA) (46). La degradación selectiva de gotitas de lípidos intracelulares mediante células fagocíticas como los macrófagos (lipofagia) también se ha descrito como fuente de energía en el CaP por proximidad al TAPP (47).

Con la finalidad de estudiar la participación del TAPP en el metabolismo y agresividad del CaP, iniciamos el estudio mediante caracterización del lipidoma de este tejido proveniente de 40 pacientes con diferentes grados de agresividad de CaP según la clasificación ISUP (n = 20 grupo I, n=0 grupo II,

n=8 grupo III, n=6 grupo IV y n=6 grupo V) mediante GC-MS para el análisis FAME y LC-MS para el análisis de acilcarnitinas y lipidómico. Respecto al análisis lipidómico, utilizamos dos plataformas: LIP-I para analizar extractos de tejido metanólico (AG libres, ácidos biliares, esteroides, oxilipinas y lisofosfolípidos) y LIP-II para extractos de tejido con cloroformo/metanol (esfingolípidos, monoacilgliceroles, diacilgliceroles, triacilgliceroles, fosfatidilcolinas y éter-fosfatidilcolinas).

Los AG se clasifican en AG saturados (SFA), que no contienen enlaces dobles en su cadena carbonada; o AG insaturados, con uno o más enlaces dobles que pueden ser monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) que incluyen PUFA omega 3 (ω -3) y PUFA omega 6 (ω -6) (48). En general el análisis por FAME del TAPP de nuestros pacientes con CaP, que aporta toda la composición celular de AG, incluidas las cadenas de acilo y los AG libres, mostró un perfil de 22 AG con una dominancia de MUFA, seguido de SFA y PUFA. Estos datos concuerdan con un estudio comparativo de TAPP de pacientes con CaP extraprostático vs TA subcutáneo sano por resonancia magnética espectroscópica *ex vivo* en un bajo número de pacientes (n=4) (49). El ácido oleico resultó ser el principal MUFA del TAPP y el ácido linoleico el principal PUFA ω -6, al igual que los resultados obtenidos por investigadores que compararon TAPP de pacientes con CaP localizado (n=12) vs con HBP (n=11) (50). En nuestra cohorte de CaP, el TAPP en ambos grupos de riesgo, presentó una baja concentración de PUFA ω -3 que puede relacionarse con una mayor proliferación tumoral según un estudio *in vitro* que relaciona el CaP con bajos niveles de ácido eicosapentaenoico, un PUFA ω -3 (51).

Al analizar este perfil de AG según la agresividad de los tumores de CaP asociados al TAPP (bajo vs alto riesgo), en las muestras de TAPP de alto riesgo detectamos una concentración significativamente mayor de MUFA. En este sentido, un estudio *in vitro* detectó que un MUFA, el ácido oleico, tendía a aumentar la invasión en una línea celular de CaP agresiva: las PC-3 (52). También observamos una cantidad significativamente menor de PUFA ω -6 en el TAPP de pacientes con CaP de alto riesgo, en consonancia con un estudio que estratificó a los pacientes con CaP en agresivos (ISUP \geq 4, estadio patológico T3) o indolentes (ISUP=1, estadio T2 patológico y PSA pre-operatorio $<$ 10ng/ml), observando una menor cantidad de un ω -6 PUFA, el ácido linoleico, en pacientes de origen africano-caribeños con CaP agresivo (53). Otros autores han comparado que en el TAPP de pacientes con CaP vs HBP, también han encontrado una proporción significativamente menor en otro ω -6 PUFA, el ácido araquidónico (50). Hay bibliografía que muestra relación entre una mayor ingesta de lípidos con un mayor riesgo y agresividad de cáncer (54) y dado que los AG ω -6 se obtienen de la dieta y no se pueden sintetizar, nuestros resultados parecen indicar que los PUFA ω -6 podrían tener un papel protector de un CaP de alto riesgo, siendo la excepción. En humanos, hasta la fecha, las revisiones sistemáticas son controvertidas y no son concluyentes respecto a la influencia de los PUFA ω -6 sobre el riesgo de CaP; no obstante, estudios *in vitro* con PUFA ω -6 en células de CaP sí muestran una supresión de la proliferación y la inflamación (55). En modelos de ratones, se ha visto que los PUFA ω -3, pero no los ω -6, inducen la apoptosis de las células de CaP (dependiente de la proteína proapoptótica Bad) (56).

En cuanto a nuestro análisis lipídico ateniendo a las categorías de lípidos, el análisis LIP-I nos reveló cantidades significativamente mayores de lisofosfatidilinositol en muestras de TAPP proveniente de pacientes con CaP de alto riesgo al compararlos con los de bajo riesgo. Este fosfolípido está presente en las membranas celulares y es una forma modificada del fosfatidilinositol mediante la acción de la fosfolipasa A, que puede tener funciones en la señalización celular, la angiogénesis y la inflamación. No obstante, la investigación de los mecanismos específicos de su relación con el cáncer aún está en etapas iniciales ya que, por ejemplo, su desregulación se ha relacionado con propiedades migratorias en cáncer de mama (57), pero en CaP aún no hay datos al respecto por lo que son necesarios más estudios. No encontramos cambios en concentraciones de lípidos entre los dos grupos de riesgo para el resto de los metabolitos estudiados en el análisis LIP-I (lisofosfatidiletanolamina y lisofosfatidilcolina) ni para ninguno de los estudiados en el LIP-II (diglicéridos, triglicéridos, esfingomiélin y fosfatidilcolinas).

Respecto al análisis de acilcarnitinas, de 30 metabolitos que se analizaron, solo encontramos diferencias significativas en el malonil carnitina (C3DC) al comparar TAPP de pacientes con CaP de bajo vs alto riesgo, siendo más alta la cantidad de este metabolito en este último grupo. El malonil carnitina es una molécula que se forma cuando el malonil-CoA se une a la carnitina. Este metabolito puede inhibir la actividad de la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 al igual que lo hace la malonil-CoA. En pacientes con cáncer, se han descrito anomalías del tejido tumoral y del metabolismo del tejido no tumoral en el sistema carnitina (y sus derivados) que se supone que contribuyen al deterioro del estado clínico de los pacientes o pueden inducir por sí mismas el desarrollo del tumor (58–60). Sin embargo, la investigación sobre este metabolito y el cáncer aún está en curso y se necesitan más estudios para explorar su potencial como diana terapéutica.

Con la finalidad de identificar lípidos con capacidad pronóstica del CaP, realizamos un análisis PLS-DA, una técnica de modelado estadístico utilizada principalmente en análisis multivariados para la clasificación y discriminación de muestras en diferentes grupos o categorías. Para ello seleccionamos 70 variables: 67 de los 267 metabolitos lipídicos que se observaron significativamente desregulados al comparar entre TAPP proveniente de los grupos de alto vs los de bajo riesgo, sumados a los SFA, MUFA y PUFA totales. El resultado PLS-DA puso de manifiesto que los metabolitos estudiados permiten distinguir entre pacientes con CaP de alto riesgo de los de bajo riesgo. Después, utilizamos en conjunción un análisis VIP con objetivo de evaluar la contribución de cada variable a la capacidad predictiva del modelo en su conjunto. De esta técnica se determinó que sólo 33 de las 70 variables tenían peso suficiente para determinar la agresividad del CaP por mostrar una puntuación ≥ 1 , lo que se considera para este tipo de análisis que son las más relevantes y tienen un mayor impacto en el modelo. Para comprobar de nuevo la utilidad pronóstica, las variables fueron reanalizadas en un segundo PLS-DA utilizando la relación Q^2/R^2 que evalúa la capacidad predictiva y la calidad del modelo. Q^2 es la medida de la capacidad predictiva del modelo, en nuestro caso qué tan bien predice el modelo la agresividad del CaP. R^2 es una medida de la proporción de la varianza total de la variable de respuesta

que es explicada por el modelo, es decir, la calidad del modelo; en nuestro caso qué tan bien explican las variables la agresividad del CaP. Nuestro cociente Q^2/R^2 fue de 0.59, lo que indica que el modelo se ajusta bien ya que un cociente $Q^2/R^2 > 0.5$ se considera un buen modelo predictivo (61).

A partir de estos datos se aplicó de nuevo un análisis mediante VIP y se determinó que 16 de las 33 variables (13OxoODE/9OxoODE; monoglicérido 18:0; triglicérido 58:1, 60:4, 56:1, 60:2, 58:2, 60:5; 12-13-EpOME; ácido behénico; ácido linoleico; PUFA total; lisofosfatidilinositol 16:0; PUFA ω -6 total; ácido laúrico; y SFA total) podrían ser útiles para pronosticar la agresividad del CaP.

Claramente vimos que tras la representación mediante un *heat map*, de estas 16 variables, las muestras de TAPP se agrupaban en función de su agresividad en bajo riesgo y alto riesgo.

Tras hacer un análisis multivariado de regresión, obtuvimos que, de las 16 variables, solo 2 se mostraron como factores independientes de la agresividad del CaP: el 12,13-EpOME y el monoglicérido (18:0). Este modelo predictivo de agresividad está pendiente de ser validado con un mayor número de muestras de TAPP. Por lo que respecta al 12,13-EpOME, se sabe que tiene diversas funciones fisiológicas, incluyendo la regulación de la inflamación, la función vascular y la señalización celular y se ha relacionado con la agresividad del cáncer de ovario, donde se ha encontrado niveles significativamente más elevados en el de tipo seroso vs no seroso (62). Respecto a este metabolito en CaP, se desconoce el papel específico, aunque sí se ha descrito que los polimorfismos CYP2D6 y CYP3A4 A392G de las monooxigenasas del citocromo P450 (enzimas que regulan eicosanoides como los EpOME) están relacionados con el desarrollo del tumor y la metástasis (63–65) e incluso se ha propuesto como estrategia para prevenir y/o tratar este tumor (66). Respecto a los monoacilgliceroles, en la literatura solo encontramos una asociación inversa entre el ácido esteárico (un componente de este tipo de lípidos) y el riesgo de CaP, aunque se necesitan más estudios al respecto (67,68).

Estas alteraciones en la composición y contenido lipídico detectadas en el TAPP revelaron una alteración clara en el metabolismo lipídico de este tejido, ya que mediante la aproximación funcional utilizando *MetaboAnalyst* (una plataforma en línea diseñada para el análisis avanzado e interpretación de datos metabolómicos), nos reveló que las vías en las que estos 16 metabolitos estaban implicados se relacionaban con alteraciones en el metabolismo del ácido linoleico, la biosíntesis de AG y la β -oxidación de AG de cadena muy larga. Al analizar en detalle la cantidad total de metabolitos SFA analizados en estas plataformas y que estaban implicados en rutas de síntesis de lípidos *de novo*, observamos que la cantidad de ácido palmítico y sus productos intermedios en el proceso de elongación de AG (ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido araquídico, ácido behénico y ácido lingnocérico) eran mayores en TAPP proveniente de pacientes con CaP de bajo riesgo. Sin embargo, al estratificar los pacientes por ISUP no se observaron diferencias, aunque si se observó una tendencia decreciente en concentración de estos metabolitos a medida que aumenta el ISUP.

Cuando analizamos metabolitos relacionados con otra de las vías alteradas, la del ácido linoleico, observamos que los productos 9-oxoODE y 13-oxoODE obtenidos tras su oxigenación por la 15-lipoxigenasa 1 (LOX-1); y 9(10)-EpOME y 12(13)-EpOME por conversión por el citocromo P450, eran más abundantes en TAPP de pacientes con CaP de bajo riesgo. En relación a estos datos y el cáncer, otros autores ya han reportado que la disminución del ácido linoleico se ha relacionado con la agresividad del CaP en la población africano-caribeña (69), que el 9(10)-EpOME está relacionado con la creación de un ambiente propicio para la carcinogénesis dado que está implicado en inflamación al actuar como ligando del factor de transcripción PPAR γ (70) y que niveles elevados de 13-HODE y 9-HODE (que proceden a 9-oxoODE y 13-oxoODE respectivamente) guarda relación con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario (62).

Quisimos comprobar si la disminución en la concentración de lípidos observada mediante el estudio lipidómico estaba relacionada con una disminución en la actividad genética asociada con estos metabolitos desregulados. Para ello estudiamos la expresión de genes en TAPP fresco relacionados con las vías metabólicas que observamos alteradas en el TAPP como: el gen que codifica para *ACACA*, que carboxila acetil-CoA a malonil-CoA, el gen *FASN* implicado en catalizar la síntesis de ácido palmítico a partir de malonil-CoA y el gen *SREBPI*, factor de transcripción que regula las dos enzimas anteriores. Los genes *ACACA*, *FASN*, y *SREBPI* analizados se expresaban menos en el TAPP que provenía de pacientes con CaP de alto riesgo. Estos datos indican una disminución de la síntesis *de novo* de AG en el TAPP de los pacientes con CaP agresivo, en concordancia con los niveles de los productos de las rutas de los metabolitos deregulados. No hemos encontrado datos sobre la expresión de estos genes en el TAPP de CaP según la agresividad, pero sí en tejido de CaP como tal; por lo que respecta a la expresión del gen *ACACA*, se sabe que la expresión es mayor en tejido prostático tumoral con relación al tejido sano y en pacientes con CaP avanzado vs de menor grado (71). Además, se ha descrito que la inhibición de la expresión de *ACACA* tiene efectos antiproliferativos en células LNCaP (72). En cuanto a la expresión del gen *FASN*, se ha establecido una asociación con el inicio y progresión de algunos tipos de cáncer como el CaP (73), siendo objeto de investigación como posible diana terapéutica, y en este sentido, cabe señalar que ciertos compuestos como el TVB-2640 ya se encuentra en fase I ya que ha mostrado suprimir el crecimiento tumoral hasta en un 97% en combinación con el fármaco paclitaxel (74). Respecto a la expresión del factor de transcripción *SREBPI*, también se ha propuesto como diana en CaP dado que se ha observado que aumenta la proliferación y la invasión del CaP (41). En este sentido, estudios *in vitro* y en modelos de ratón han demostrado que el bloqueo de las vías metabólicas reguladas por SREBP mediante la fatostatina, frena el crecimiento y la metástasis del CaP, efectos potenciados en combinación con el fármaco docetaxel (75,76).

También cuantificamos la expresión del gen que codifica para el factor de transcripción *PPARG*, que se ha demostrado que puede favorecer el crecimiento del CaP a través de su función en la síntesis de AG, la biogénesis mitocondrial y su cooperación con la señalización del AR (77).

La expresión del gen *PPARG* en el TAPP de pacientes con CaP agresivo, fue menor que en el TAPP que provenía de pacientes con CaP menos agresivo. Esta observación está en consonancia con la expresión obtenida en el metabolito 13-oxoODE para el TAPP de alto riesgo, 13-oxoODE se ha descrito como ligando endógeno de *PPAR γ* en cáncer de colon (78).

Otro gen está estrechamente regulado por *PPARG*, es la *ADIPOQ* (79) cuya expresión se detectó significativamente más disminuida en el TAPP procedente de pacientes con CaP de alto riesgo.

Por lo que respecta a la lipólisis seleccionamos el gen de la lipasa *LIPE* implicada en la lipólisis por hidrolizar los triglicéridos almacenados en AG libres, y observamos que la expresión de este gen es menor en el TAPP de muestras de pacientes con CaP de alto riesgo. Algunos autores han demostrado que la lipólisis basal (medida mediante cromatografía de gases) aumenta ligeramente en los explantes de TAPP provenientes de un CaP menos agresivo (Gleason score (GS) $\leq 3 + 4$) en comparación con los más agresivos (GS $\geq 4 + 3$) aunque sin llegar a ser significativo (80). En los CAA de cáncer de mama se han descrito niveles bajos de la enzima codificante de la *LIPE* y de la *HSL* (12).

Otro dato interesante es que el TAPP de pacientes con CaP de alto riesgo presentaba un perfil inflamatorio alterado, puesto que al analizar la expresión de los genes inflamatorios *IL-6*, *TNF α* y *IL-1B*, detectamos una expresión significativamente más elevada para la *IL-6* y una tendencia a mayor expresión de *TNF α* y de *IL-1B*, dato que apoyaría el efecto potenciador de la agresividad del tumor del TAPP y viceversa, ya sea por efectos directos sobre las células premalignas o actuando sobre el microambiente tumoral (81). Respecto a la *IL-6*, Zhang *et al.* también demostraron que su expresión se eleva significativamente en el TAPP en relación con una mayor agresividad del CaP (82,83). Además, Finley *et al.*, han atribuido la secreción de esta citoquina por parte del TAPP, como otra causa agregada en la agresividad del CaP (84). En este sentido existen varios ensayos clínicos en fase I/II que están evaluando anticuerpos contra *IL-6* como Siltuximab que ya han mostrado resultados prometedores (85). En cuanto a la citoquina *TNF- α* , un estudio detectó mediante histoquímica un incremento en sus niveles en el TAPP de pacientes con CaP de alto riesgo (86).

En definitiva, el perfil inflamatorio que observamos en el TAPP de CaP de alto riesgo, podría estar relacionado con la baja expresión del gen *PPAR γ* y del gen *ADIPOQ*, ya que estos genes regulan la expresión del factor de transcripción *NF- κ B* (87–89), bien conocido por su papel crucial en activar la expresión de citoquinas inflamatorias.

Hasta aquí podemos concluir con los datos obtenidos, que el TAPP proveniente de pacientes con CaP de alto riesgo muestra un perfil de expresión genética alterado relacionado con el metabolismo lipídico y con el perfil inflamatorio.

Los estudios de lipidómica nos proporcionaron una foto del estatus metabólico del TAPP meramente observacional, por lo que realizamos co-cultivos de explantes de TAPP con líneas celulares de CaP, para demostrar el efecto directo del TAPP sobre el metabolismo lipídico del CaP.

Para ello utilizamos dos líneas celulares de CaP: LNCaP, andrógeno dependiente, como modelo de CaP menos agresivo y confinado al órgano como nuestros pacientes; y PC-3, andrógeno independiente, como modelo de CaP más agresivo.

Interesantemente observamos un efecto de “delipidación” del TAPP tras ponerse en contacto con las células de CaP (independientemente de la línea celular utilizada y de si el TAPP provenía de un paciente con bajo o alto riesgo de CaP), puesto que detectamos una reducción en la expresión de genes involucrados en la lipogénesis (*FASN*, *SREBP1* y *PPARG*); en el transporte de AG a través de membrana (*CD36*) y desde citosol a la mitocondria (*CPT1*); y en la hidrólisis de AG (*PNPLA2*). Este dato podría indicar que los adipocitos del TAPP están proporcionando lípidos a las células tumorales participando en la proliferación y por ende en la agresividad, como se ha sugerido en tumores como el de ovario (90) y mama (91).

Estos datos estaban respaldados por la expresión del gen transportador de lípidos *FABP4* en el TAPP, que estaba aumentado independientemente del grado del tumor lo que apunta a una movilización citoplasmática activa de AG hacia las células de CaP.

Por otra parte, este fenotipo “delipidado” del TAPP, parece ser además provocado por las células de CaP absorbiendo los AG liberados por los adipocitos de TAPP, promoviendo la lipogénesis *de novo* y lipólisis celular. Llegamos a esta idea dado que tras el co-cultivo, observamos que las células de CaP tenían un comportamiento inverso respecto al TAPP: una mayor expresión de genes transportadores de lípidos (*CD36*, *FABP4*, *CPT1A* y *FATP5*) e implicados en la lipogénesis (*FATP5*, *SREBP1* y *FASN*) y lipólisis (*PNPLA2*), en las líneas después de estar en contacto con el TAPP en co-cultivo, aunque los tres últimos genes no mostraron diferencias en la línea celular LNCaP. En este sentido, otros autores han demostrado la incorporación de AG por parte de las células de CaP de los adipocitos vecinos y que existe una absorción similar de lípidos exógenos en varios modelos de células de CaP (92,93).

El incremento en la expresión de genes implicados en el transporte de AG en las células de CaP se observó asociado a una mayor captación de estos mediante ensayos de *TF2-C12 fatty acid* y además observamos que estos lípidos se acumulaban en el citoplasma de las células de CaP mediante la técnica del *Nile red*. Las LNCaP mostraron una absorción significativamente mayor de lípidos en comparación con las células PC-3 tras el co-cultivo con TAPP tanto de bajo como de alto riesgo, y no se observaron diferencias en la acumulación o en las tasas de absorción en ninguna línea celular independientemente de la agresividad del explante de TAPP. El uso de otras técnicas como la microscopia infrarroja por parte de otros autores ya habían mostrado que las células de CaP pueden absorber los AG liberados por adipocitos (46).

Observamos también que tras el co-cultivo de las células de CaP con TAPP, se podía detectar un aumento en la inflamación en ambas líneas de CaP (LNCaP y PC-3) cuando cuantificamos la expresión de genes *IL-6* e *IL-1B* tras el co-cultivo con explantes de TAPP e independientemente de la agresividad del explante utilizado. Otros autores que han trabajado con células de cáncer de mama co-cultivadas con adipocitos, ya han reportado la sobreexpresión de estas citoquinas proinflamatorias (12).

También observamos que ambas líneas celulares de CaP (LNCaP y PC-3) adquieren propiedades agresivas tras los experimentos de co-cultivos con explantes de TAPP independientemente de la agresividad del explante, dato que corroboramos mediante la determinación de la expresión elevada de genes implicados en eventos tumorales como la invasión y la metástasis (*TWIST1*, y *MMP-9*) (94,95). Ya se ha reportado que los lípidos acumulados en las células de CaP provenientes del TAPP aumentan el estrés oxidativo y, en consecuencia, la expresión de otra metaloproteasa, la MMP-14, lo que confiere una ventaja invasiva a las células tumorales (92). Además, en las PC-3, observamos un aumento en la expresión del gen *ESRRA* (Receptor alfa relacionado con el estrógeno), relacionado con la proliferación y migración (96).

Parece ser por tanto que podría ser factible el uso de agentes dirigidos al metabolismo de ciertos lípidos para tratar el CaP, sobre todo, teniendo en cuenta que la dependencia del CaP de la β -oxidación de AG mitocondrial es una vulnerabilidad que podría explotarse en beneficio del paciente. No obstante, según los hallazgos actuales es poco probable que los compuestos estudiados hasta ahora como el etoximir y la perhexilina (inhibidores de CPT1A) (97,98) reemplacen a las terapias disponibles actualmente, sobre todo en aquellos que el tumor ha metastatizado, aunque se podrían combinar para mejorar la supervivencia del paciente (69).

Por otra parte, pensamos que la supresión de la captación de AG que proceden del TAPP por parte de las células de CaP, es otra diana interesante como tratamiento para este tumor, algo que ya otros investigadores han valorado y estudiado en modelos preclínicos humanos y de ratones obteniendo la ralentización de la progresión del tumor tras la inactivación del transportador CD36. Además, la terapia con anticuerpos dirigidos al transportar CD36 ha mostrado una reducción en la gravedad del CaP en xenoinjertos derivados de pacientes (99).

Hasta la fecha, apenas encontramos dos estudios detallados y cuantitativos del lipidoma del TAPP (50,53) pero muestran variabilidad en cuanto a tecnología utilizada, tipo de población o el grupo y tamaño muestral. Además, ninguno de los autores contempla todos los grupos de riesgo. Así pues, el estudio que aquí presentamos es el primer análisis completo del lipidoma de TAPP que incluye todos los grupos de riesgo mostrando que la composición lipídica del TAPP está alterada en pacientes con CaP de alto riesgo. Además, nuestro estudio lipídico del TAPP demuestra que las alteraciones lipídicas encontradas en estos tejidos están vinculadas a la actividad biológica de las células del tumor. En este sentido, este trabajo proporciona por primera vez evidencias de la participación del TAPP en la agresividad del tumor de próstata que, tras su validación en cohortes más grandes, puede explotarse como pronóstico y ser fuente de desarrollo de posibles tratamientos del CaP.

Impacto epigenético de los exomiARNs contenidos en las VEs secretadas por el TAPP en la agresividad del CaP

Nuestro segundo abordaje fue indagar en la capacidad del TAPP para regular epigenéticamente, mediante la liberación de miARNs contenidos en VEs, exomiARNs, la actividad celular de las células de CaP, con objetivo de comprender mejor el impacto del TAPP sobre la agresividad del tumor de próstata y así poder aportar nuevas dianas moleculares como posibles estrategias terapéuticas.

Las VEs son liberadas por el microambiente tumoral y por el propio tumor (100). Actualmente el estudio de estas partículas en el cáncer aporta mucha información sobre posibles regulaciones de que ejercen en la progresión tumoral y la metástasis (101,102). El TA que rodea al tumor puede modular la adquisición y el mantenimiento de rasgos distintivos del cáncer a través de VEs, tal y como se ha demostrado en cáncer de mama (103) o melanoma (104). Por lo que respecta al CaP, partimos de la hipótesis de que las VEs secretadas por el TAPP podrían estar contribuyendo a la progresión del CaP; en concreto, a través de su contenido en exomiARNs.

Para confirmar dicha hipótesis, aislamos las VEs secretadas por TAPP a partir de explantes que provenían de pacientes con CaP y que tenían diferentes grados de agresividad del tumor. Tras colocar los explantes de TAPP en medio de cultivo 24 horas, y realizar un primer *cut-off* de 0,8 μm , eliminamos células, estructuras membranosas y VEs de tamaño superior a 800 nm tales como cuerpos apoptóticos provenientes de la extrusión de la membrana celular como parte del proceso apoptótico (105). De este medio se aislaron las VEs utilizando un método de unión por afinidad bioquímica basado en membrana del cual se obtienen las que oscilan entre 50-300 nm.

Una vez aisladas las VEs, se verificó la presencia de biomarcadores específicos de superficie (106) mediante la técnica de *Western Blot* confirmándose así la presencia de marcadores de superficie típicos de VEs como las proteínas transmembrana multipaso CD9 y CD81 (tetraspaninas) y la proteína citosólica de choque térmico HSP70. En las VEs secretadas por TAPP no se detectó la presencia de tubulina (marcador celular específico) ni de CD36 (otra tetraspanina), tampoco de la proteína citosólica TSG101 (*Tumor Susceptibility 101*). Además, analizamos las VEs mediante estudios de morfología y tamaño por microscopía de transmisión de electrones, que permitió la visualización de una bicapa lipídica característica de las VEs (105), y un diámetro que oscila entre 30 y 200 nm propio de VEs pequeñas-medianas (107).

Las VEs secretadas por el TAPP son captadas e internalizadas por las células de CaP *in vitro* ya que mediante microscopía confocal y el uso de un colorante fluorescente asociado a lípidos (PKH67) que se une a las VEs, se comprobó que se localizaban en el citoplasma de las células de CaP a las 3 horas.

Este proceso de internalización de VEs por la célula receptora puede darse o bien por fusión de las VEs con la membrana celular diana y liberación de su contenido al citoplasma o bien mediante internalización en los compartimentos endocíticos y/u otros compartimentos intracelulares de la célula, con o sin fusión de la membrana celular (106).

Con objetivo de determinar el efecto epigenético de las VEs secretadas por el TAPP en la progresión del CaP, aislamos su contenido de exomiARNs mediante afinidad bioquímica (un proceso similar al utilizado en el aislamiento de las VEs). En una primera aproximación, utilizamos las VEs aisladas de TAPP (VEs-TAPP) de 4 pacientes con CaP de alto riesgo (ISUP III, IV y V) y también utilizamos VEs aisladas de TA perivesical sano (VEs-TAPV) de los mismos pacientes como control. Después del análisis de expresión diferencial por *microarrays* que contenían 752 exomiARNs relacionados con cáncer, un total de 11 se detectaron significativamente sobreexpresados en las VEs-TAPP al compararlos con los de VEs-TAPV (el prefijo hsa atiende a: *Homo sapiens*): hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-126-3p. Así como un total 4 exomiARNs se detectaron menos expresados en las VEs-TAPP vs las VEs-TAPV: hsa-miR-488-5p, hsa-miR-2113, hsa-miR-1227-3p y hsa-miR-92b-5p; aunque solo el hsa-miR-488-5p mostro significancia en algunas muestras. Se validaron los 11 exomiARNs que resultaron estar sobreexpresados en 24 muestras de VEs-TAPP y observamos diferencias significativas en 8 de los 11 exomiARNs al comparar VEs-TAPV vs VEs-TAPP: hsa-miR-17-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-106b-5p y hsa-miR-18a-5p.

La alteración en la composición y niveles de expresión de los exomiARNs en las VEs-TAPP podría ser una consecuencia directa de la acción que ejerce el tumor de próstata sobre este tejido graso que rodea al tumor. En este sentido, ya se ha descrito una estrecha asociación entre los miARNs derivados del TA de ratones con diabetes y el desarrollo del CaP en estos modelos animales (108). Por otro lado, el estado inflamatorio crónico presente en cualquier microambiente tumoral, podría afectar a la liberación y contenido en exomiARNs de las VEs secretadas del entorno al tumor. Por ejemplo, en cáncer de pulmón, la inflamación induce la expresión de exomiR-191 y estimula su carga en VEs, promoviendo la progresión de EMT (109).

Al analizar la expresión de los exomiARNs más expresados en VEs-TAPP estratificando según la agresividad del CaP (bajo riesgo= ISUP I y II o alto riesgo= ISUP III, IV y V), solo se detectaron diferencias significativas para el hsa-miR-18a-5p, que se encontraba sobreexpresado en las VEs-TAPP de los pacientes con tumores de bajo riesgo. Interesantemente, observamos que la expresión de los 8 exomiARNs en las VEs-TAPP de CaP de bajo riesgo, era significativamente mayor cuando los comparábamos con los de las VEs-TAPV, mientras que esta diferencia no se observó al compararlos con los exomiARNs procedentes de VEs-TAPP de CaP alto riesgo.

Las diferencias en cantidad de exomiARNs entre TAPP y TAPV, refuerza la hipótesis de que el tumor está alterando al TAPP y podría estar implicándolo en la agresividad del CaP. Además, estos datos apuntan a que la comunicación intercelular podría ser más activa en los tumores menos agresivos, favoreciendo una mayor liberación de VEs cargadas de exomiARNs como parte de esta respuesta por el TAPP ante el desarrollo inicial del tumor.

Para revelar las dianas de los exomiARNs desregulados en las VEs-TAPP, utilizamos el software *miRNet*, programa dirigido a identificar genes diana de miARNs (según las bases de datos *miRTarBase* v8.0 y *TarBase* v8.0). Detectamos 4 genes como posibles dianas comunes: *RAR Related Orphan Receptor A (RORA)* y 3 *Zinc Finger Proteins (ZNF134, ZNF217 y ZNF264)* pero únicamente el gen *RORA* estaba implicado significativamente en todas las vías analizadas.

El gen *RORA*, denominado también $ROR\alpha$ o *NR1F1* (Subfamilia de receptores nucleares 1 Grupo F Miembro 1), está compuesto por 15 exones ubicados en medio del cromosoma 15q22.2. El gen *RORA* es un receptor huérfano nuclear que pertenece a la subfamilia ROR (receptor de ácido retinoico), que engloba también a los miembros $ROR\beta$ y $ROR\gamma$ (110,111), proteínas citosólicas que tras activarse actúan como factores de transcripción. En humanos, el gen *ROR α* se ha descrito como supresor de tumores en piel, colon, hígado, próstata, melanoma y mama (111). Por otro lado, datos preliminares del gen *ROR β* apuntan a que puede comportarse como supresor de tumores u oncogen dependiendo el tipo de tumor (111); y que el gen *ROR γ* actúa como un oncogen y su expresión está aumentada en la mitad de los adenocarcinomas de próstata y cáncer de mama estudiados (112,113). El gen *RORA* genera por corte y empalme alternativo (fenómeno denominado *splicing*), 4 isoformas en humanos que difieren en la región N-terminal (114). La variante $\alpha 1$ se expresa en tejido sano de mama, cerebro, próstata, hígado y ovario. Las variantes $\alpha 2$ y $\alpha 3$ solo se expresan en humanos, aunque las principales variantes en próstata son $\alpha 1$ y $\alpha 4$ (115). Como ligandos endógenos del gen *RORA* se han descrito el colesterol y derivados (116,117). El gen *RORA* regula una gran variedad de actividades celulares por unión directa al ADN (vía canónica) o por acoplamiento a otras moléculas como β -catenina (vía no canónica) (116,118).

Las vías de nuestro análisis por *Reactome*, reflejaron la implicación del gen *RORA* en la activación de la expresión de genes nucleares como *SBREPI* y mitocondriales como *CPT1A*. En este sentido, se ha descrito que la implicación del gen *RORA* en el metabolismo es debida a la regulación negativa de genes implicados en la homeostasis de la glucosa y de los lípidos, como *PPARG* y *SREBP1* (119,120). Además, también detectamos que el gen *RORA* podría estar involucrado en la activación de la expresión de genes implicados en el ciclo circadiano como *BMAL1 (Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1)*, *CLOCK* (Regulador del reloj circadiano) y *NPAS2* (Proteína 2 del dominio PAS neuronal) actuando a través de la vía canónica y mediante la regulación de elementos E-box en sus promotores (121). La interrupción de los ritmos circadianos por deficiencia del gen *RORA* se asocia con un riesgo elevado de padecer cáncer en modelos de ratones (116).

En CaP en concreto, aunque se han realizado un número limitado de estudios epidemiológicos, se han encontrado varios genes circadianos implicados en la regulación de este tumor, entre ellos el gen *RORA*, regulado a la baja (113,122). Incluso un polimorfismo del gen *RORA*, rs17191414, se ha asociado con el riesgo de CaP, aunque estos datos están pendientes de ser validados (122). Otra vía en la que el gen *RORA* podría estar implicado es en la transcripción de receptores nucleares como el receptor de estrógenos y andrógenos en el cáncer de mama y próstata respectivamente (118).

El análisis de enriquecimiento funcional de redes de interacción proteína-proteína relacionó a la proteína RORA con 10 proteínas implicadas en crecimiento celular (KAT5: Lisina acetiltransferasa 5, STAT3); diferenciación, inflamación y apoptosis (BCL6); diferenciación de células T (BATF: *Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor*); hipoxia, angiogénesis y metástasis tumoral (HIF1A); y ciclo circadiano (ARNTL o BMAL1, NRIP1: *Nuclear Receptor Interacting Protein 1*, NPAS2 y CLOCK). En este sentido y en línea con las proteínas que RORA interacciona, se ha relacionado al gen *RORA* con la hipoxia porque participa en el control de genes implicados en este proceso (115) y como importante modulador negativo de la angiogénesis en el cáncer de mama (118). En cuanto a la proliferación celular, Moretti *et al.*, han demostrado *in vitro* que la isoforma *RORa1* afecta la progresión del ciclo celular de la línea celular de CaP DU145 mediante la modulación de genes como p21 (Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1a) y la ciclina A (123). Además, estos investigadores activaron *in vitro* el gen *RORA* en células DU145 y PC3, y observaron una inhibición de 5-LOX, de forma que esta enzima no convertía los AG en 5-HETE, otro gen responsable del efecto proliferativo en las células de cáncer (124). En cáncer de mama, también se ha observado que la sobreexpresión del gen *RORA* tiene un efecto negativo en el crecimiento celular (115). La presencia de la proteína RORA se ha descrito como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria en células humanas de músculo liso (125) y como atenuante inflamatorio en homeostasis intestinal (126). También la proteína RORA se ha descrito que participa en la apoptosis ya que es capaz de regular genes sensibles a p53, disminuyendo la supervivencia celular (127,128).

Dada la importante relación del gen *RORA* con procesos oncogénicos en CaP y en otros tipos de tumores, analizamos los niveles de expresión del gen *RORA*, así como de los exomiARNs desregulados en las VEs-TAPP en tumores de CaP. Para ello recopilamos datos de tejido humano de próstata no tumoral y tumoral de 52 pacientes utilizando el TCGA-PRAD (*The Cancer Genome Atlas Prostate Adenocarcinoma*) incluido en la base de datos *CancerMIRNome*, que permite el análisis interactivo y la visualización de perfiles de expresión de miARNs (no exomiARNs puesto que analiza la expresión en tejidos) basados en 33 tipos de cáncer. Comprobamos que el gen *RORA* estaba significativamente menos expresado en tejido tumoral en comparación con tejido no tumoral. Además, al estratificar los pacientes según el grado de tumor (bajo=ISUP I y II; y alto=ISUP III, IV y IV), observamos que la expresión del gen *RORA* se reducía en función de la agresividad del tumor, aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

En cuanto a la expresión de los miARNs y tras el estudio de sus dianas sobre el gen *RORA* (utilizando el programa *StarMir*), seleccionamos 4 miARNs: el hsa-miR 20a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-93-5p y hsa-miR-17-5p por ser los miARNs con mayor probabilidad logística de unión al gen *RORA*, y comprobamos que estaban sobreexpresados en tejido tumoral al compararlo con el tejido no tumoral.

Los datos obtenidos en el *CancerMIRNome* los validamos utilizando tejido de próstata no tumoral y tejido de CaP tumoral paraafinado de una cohorte de 32 pacientes de nuestra colección. Los resultados obtenidos fueron similares, una disminución de la expresión del gen *RORA* en muestras de tumor al compararlas con las zonas no tumorales, algo ya reportado por otros autores (129); y por lo que respecta a la expresión de los miARNs, el patrón se reproducía igual que en *CancerMIRNome*: estaban sobreexpresados en muestras de CaP tumoral al compararlas con tejido no tumoral.

El control epigenético de los exomiARNs derivados de VEs sobre el gen *RORA*, se validó utilizando las células 22Rv1 de CaP ya que el patrón de expresión del gen *RORA* es similar al de los tejidos tumorales de CaP. Para ello, las 22Rv1 se transfectaron con inhibidores de miR-20a-5p, miR-106b-5p y/o silenciadores del *RORA*. El silenciamiento del gen *RORA* redujo la expresión génica como era de esperar y tras la inhibición individual de miR-20a-5p o miR-106b-5p, se observó un aumento de la expresión del gen *RORA*. Sin embargo, al inhibir simultáneamente el gen *RORA* y el miR-20a-5p o el miR-106-b-5p, confirmamos que tanto el miR-20a-5p como el miR-106b-5p, regulan la expresión del gen *RORA* ya que se observó una recuperación parcial de la expresión del gen *RORA*. Los datos de expresión génica se validaron también con experimentos de expresión de proteína.

Con objetivo de comprobar si el efecto epigenético que ejercen los miARNs 20a-5p y 106b-5p sobre el gen *RORA* se traduce en un efecto celular, nos centramos en determinar si esta interacción afectaba a funciones asignadas a este gen como la proliferación (123,124) y la inflamación (130).

Para la proliferación, utilizamos un kit (CCK-8) que se basa en la capacidad de las células vivas para reducir el reactivo tetrazolio a un producto soluble (formazan) de color amarillo que cuantificamos espectrofotométricamente (450 nm) y cuya cantidad es directamente proporcional al número de células vivas. En estos ensayos observamos un aumento significativo de la proliferación de células 22Rv1 tras silenciar el gen *RORA*, y una disminución significativa de la proliferación tras inhibir el miR-20a-5p, por lo que ambos están involucrados en proliferación, algo que no se demostró para el miR-106b-5p. Tras la co-inhibición simultánea del gen *RORA* y el miR-20a-5p, observamos una recuperación parcial de la proliferación celular, dato que implica al miR-20a-5p en la regulación de la proliferación de las células de CaP 22Rv1 a través del gen *RORA*. Sin embargo, la co-inhibición del gen *RORA* juntamente con el miR-106b-5p no mostró ningún efecto en la proliferación de células 22Rv1.

Según se ha descrito, el efecto antiproliferativo del gen *RORA* en las células de CaP, puede ser ejercido a través de una regulación negativa de c-jun, c-myc y la ciclina D1, implicados en la regulación del ciclo celular y la proliferación (131). Otra vía de acción antiproliferativa por parte del gen *RORA* que se ha propuesto en otros tumores como el de mama, incluye su acción inhibitoria sobre el eje Wnt/ β -catenina (116).

Para determinar la implicación del gen *RORA* en la inflamación en CaP a través de la regulación por miARNs, se silenció el gen en las células 22Rv1, lo que provocó un aumento en la expresión del gen de la citoquina *TNF- α* , expresión que se vio disminuida al inhibir tanto el miR-106b-5p como el miR-20a-5p, lo que indica que el gen *RORA* y ambos miARNs están involucrados en la regulación de la inflamación en las células de CaP. Tras la inhibición simultánea del gen *RORA* y miR-20a-5p, observamos un ligero aumento de la expresión del gen *TNF- α* que no se observó cuando se co-inhibía *RORA* y el miR-106b-5p. Con los datos obtenidos podemos concluir que el miR-20a-5p participa en la inflamación a través de la regulación negativa del gen *RORA* en la línea de CaP 22Rv1.

Este resultado es de gran interés puesto que la inflamación aguda y crónica se han asociado a la progresión de diferentes tumores como el de colon (133) e hígado (132). La implicación del gen *RORA* en la inflamación comenzó a esclarecerse en estudios iniciales en la enfermedad inflamatoria intestinal y la colitis ulcerosa que reflejaron asociaciones negativas con NF- κ B (bien conocido por ser mediador clave en la inflamación). En este sentido, la eliminación del gen *RORA* en la línea celular monocítica humana THP-1, provoca un aumento en la expresión de genes regulados por NF- κ B, incluidos *IL-1 β* e *IL-6*, tanto a nivel transcripcional como traduccional (130). Entre los mecanismos que podrían estar implicados está el reclutamiento de HDAC3 (histona deacetilasa 3) responsable de la función transrepresiva de NF- κ B (115); así como la regulación positiva de I κ B α , el principal inhibidor de la vía de señalización NF- κ B, algo que se observado con la variante *ROR α 1* (124). La relación entre NF- κ B y el gen *TNF- α* ya se ha descrito (132). Los datos apuntan a que tras la secreción de TNF- α por macrófagos, aumenta la actividad de NF- κ B y las células tumorales producen sustancias como CSF-1 y COX-2, que estimulan aún más los procesos inflamatorios, así como proteínas como Bcl, que inhiben la apoptosis (133). En este sentido, por lo que respecta al gen *RORA*, ya hay estudios que vinculan su expresión con el gen *TNF- α* , como es el que demuestra que *ROR α 1* inhibe la secreción de las citoquinas *IL-6*, *IL-8* y la expresión de *COX-2* inducida por *TNF- α* en células primarias de músculo liso aórtico humano (124). Hasta lo que sabemos, nuestro estudio es el primero en reportar la asociación del gen *RORA* con la expresión de *TNF- α* en CaP a través de la regulación epigenética de exomiARNs contenidos en VEs secretadas por el TAPP.

Respecto a la regulación epigenética del gen *RORA* en cáncer, se ha descrito que, en gliomas humanos, el gen *RORA* está regulado negativamente por el miR-18a inhibiendo la proliferación y tumorigénesis del glioma a través de la vía de señalización NF- κ B mediada por TNF- α (134). En CaP, Li *et al.*, implicaron el hsa-miR-1290 (descrito previamente como oncogen y que se obtuvo tras analizar un conjunto de datos de miRNA-seq disponible públicamente de muestras de próstata de la base de datos GEO) con la proliferación, migración e invasión del CaP a través de su gen diana *RORA* tal y como vieron *in vitro* utilizando células PC-3 y en un modelo de ratón de xenoinjerto (128).

Respecto al miR-20a-5p, se le ha relacionado con diferentes procesos oncogénicos. En este sentido, en cáncer de colon, Cheng *et al.*, descubrieron mediante programas bioinformáticos de predicción, que el miR-20a-5p regula el gen *Smad4* (Miembro de la familia SMAD 4) promoviendo la invasión y metástasis (135). En cáncer de mama, se ha demostrado que el miR-20a-5p regula epigenéticamente al gen *RUNX3* (Factor de transcripción familiar RUNX 3), implicado en la migración y proliferación (136).

Por lo que respecta a CaP en concreto, hay pocos datos en la literatura que relacionen el control epigenético de miR-20a-5p con el desarrollo y la progresión del tumor de próstata. Uno de ellos implica al miR-20a-5p en la regulación del gen *CX43* (Proteína Gap Junction Alfa 1), implicado en viabilidad celular y proliferación según experimentos *in vitro* (células MDA-PCa-2b y LNCaP) como *in vivo* (modelo de xenoinjerto murino) (137). Otros autores identificaron otro gen diana de miR-20a-5p, el *ABL2* (Protooncogén 2 ABL, tirosina quinasa no receptora), implicado en invasión y migración en células PC-3 y DU145 a través de la regulación de este gen (138).

En lo que se refiere al miR-106b-5p, en la bibliografía encontramos datos que demuestran también su implicación en diversos procesos tumorales a través de la regulación de la expresión de varios genes. En este sentido, Xiao *et al.*, han implicado al miR-106b-5p, a través de la regulación del gen *CTSA* (Catepsina A), en el proceso de migración e invasión de células de cáncer colorrectal mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* (modelos de ratón inyectados con células tumorales) (139). En otro estudio, los autores se centraron en demostrar el efecto del exomiR-106b-5p derivado de exosomas de células de melanoma en el proceso EMT de melanocitos a través del gen *EphA4* (Receptor EPH A4), lo que lleva al establecimiento de un microambiente que apoya la metástasis tumoral (140).

En cuanto a la implicación epigenética de miR-106b-5p en el CaP, se han publicado dos estudios. En uno, Wing *et al.*, han demostrado que el miR-106b-5p funciona como oncogen y regula la viabilidad y la metástasis del tumor al dirigirse a *LARP4B* (La Ribonucleoproteína 4B) en células LNCaP (141). En el otro estudio, Dankert *et al.*, demuestran que la pérdida del gen *RBMS1* (*RNA Binding Motif Single Stranded Interacting Protein 1*), como diana regulada por miR-106b-5p, influye en el crecimiento celular, invasión y la formación de colonias en células LNCaP y DU145 (142).

En definitiva, los resultados aquí presentados sugieren que existe una regulación epigenética ejercida por los exomiARNs 20a-5p y 106b-5p de las VEs secretadas por el TAPP, que favorece la progresión y regulan la inflamación potenciando la agresividad del tumor de CaP.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

V. Conclusiones

- El perfil de AG del TAPP de pacientes con CaP de alto riesgo, en comparación con aquellos de bajo riesgo, muestra una mayor concentración de MUFA y lisofosfatidilinositol, y una menor concentración de PUFA ω -6. Los niveles reducidos de 12,13-epoxioctadecenoico y el monoglicérido (18:0) en el TAPP son predictores independientes de la agresividad del CaP. Las alteraciones en la composición de lípidos en el TAPP de pacientes con CaP de alto riesgo, se asocian con una reducción del metabolismo del ácido linoleico, la biosíntesis de AG y la β -oxidación de AG de cadena muy larga
- Las alteraciones en la composición de lípidos del TAPP de pacientes con CaP de alto riesgo están vinculadas a un perfil de expresión alterado de genes implicados en el metabolismo lipídico (menor expresión de los genes *FASN*, *ACACA*, *PPARG*, *SREBP1*, *LIPE* y *ADIPOQ*) y a una mayor inflamación del TAPP en estos pacientes (sobrexpresión de los genes *IL-6*, *IL-1B* y *TNF α*)
- El contacto del TAPP y las células del CaP provoca una “delipidación” del TAPP asociada a una movilización de lípidos hacia las células de CaP, así como una mayor inflamación del TAPP. Por el contrario, en las células tumorales aumenta la lipogénesis, lipólisis, transporte, captación y acumulación de AG lo que potencia su agresividad, reflejado en un aumento en la expresión de marcadores tumorales implicados en invasión, metástasis (*TWIST1* y *MMP-9*), proliferación y migración (*ESRRA*)
- El TAPP de pacientes con CaP libera partículas con características propias de VEs, que poseen un tamaño pequeño-medio (30-200 nm) y son internalizadas por las células de CaP
- En las VEs-TAPP de pacientes con CaP, nueve exomiARNs están sobreexpresados (exomiR-363-3p, -126-3p, -93-5p, 17-5p, 20a-5p, 106b-5p, 106a-5p, 18b-5p y -18a-5p), y cuatro exomiARNs disminuidos (exomiR-488-5p, -2113, -1227-3p y -92b-5p) en comparación con los exomiARNs de las VEs-TAPV
- La predicción de interacciones exomiRNA-gen *in silico*, identificó al gen *RORA* como diana común de los 9 exomiARNs sobreexpresados en VEs-TAPP vs VEs-TAPV
- La predicción de rutas *in silico* en las que el gen *RORA* está involucrado, reveló su implicación en la activación de la expresión de genes nucleares (*SREBP1*), mitocondriales (*CPT1*) y genes relacionados con el ritmo circadiano (*BMAL1*, *CLOCK* y *NPASP2*)
- Los métodos de análisis de interacción proteína-proteína revelan que la red de proteínas con que interacciona la proteína *RORA*, está asociada con procesos tumorales tales como la hipoxia, la angiogénesis, la metástasis, el crecimiento celular, la inflamación y la apoptosis
- La expresión del gen *RORA* está disminuida en tumores humanos de CaP, mientras que los exomiR-20a-5p, -106b-5p y -93-5p de VEs-TAPP están sobreexpresados. Esto también ocurre en la línea celular de CaP 22Rv1

- El exomiR-20a-5p regula epigenéticamente al gen *RORA* y por lo tanto, indirectamente, la inflamación y proliferación en células de CaP 22Rv1

Conclusión general:

El TAPP interactúa con el tumor de próstata a nivel metabólico, provocando cambios en el metabolismo lipídico de las células del CaP que afectan a procesos tumorales y a nivel epigenético a través de miARNs liberados en VEs que controlan la inflamación y la proliferación del tumor.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

VI. Bibliografía

1. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The epidemiology of prostate cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(12): a030361.
2. Larrañaga N, Galceran J, Ardanaz E, Franch P, Navarro C, Sánchez MJ, et al. Prostate cancer incidence trends in Spain before and during the prostate-specific antigen era: Impact on mortality. *Annals of Oncology*. 2010; 21 Suppl 3:iii83-89.
3. Hinata N, Fujisawa M. Racial Differences in Prostate Cancer Characteristics and Cancer-Specific Mortality: An Overview. *World Journal of Men's Health*. 2022; 40(2):217-227.
4. Chinaranagari S, Sharma P, Bowen NJ, Chaudhary J. Prostate Cancer Epigenome. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1238:125–40.
5. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho S, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 2004; 101(10 Suppl):2371-490.
6. Michaud DS, Augustsson K, Rimm EB, Stampfer MJ, Willet WC, Giovannucci E. A Prospective Study on Intake of Animal Products and Risk of Prostate Cancer. *Cancer causes & control*. 2001;12(6):557–67.
7. Caini S, Gandini S, Dudas M, Bremer V, Severi E, Gherasim A. Sexually transmitted infections and prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol*. 2014;38(4):329–38.
8. Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohmé I, Forsberg B, et al. Cancer risk after renal transplantation in the nordic countries, 1964–1986. *Int J Cancer*. 1995;60(2):183–9.
9. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2017;317(24):2532–42.
10. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, et al. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):9.
11. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(6 Pt A):1238-60.
12. Eminaga O, Hinkelammert R, Abbas M, Titze U, Eltze E, Bettendorf O, et al. High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN) and topographical distribution in 1,374 prostatectomy specimens: Existence of HGPIN near prostate cancer. *Prostate*. 2013;73(10):1115–22.
13. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. *Genes and Development*. 2010; 24(18):1967-2000.
14. Briganti A, Capitanio U, Suardi N, Gallina A, Salonia A, Bianchi M, et al. Benign Prostatic Hyperplasia and Its Aetiologies. *European urology supplements*. 2009;8(13):865–71.
15. Morote J, Borque-Fernando Á, Triquell M, Campistol M, Celma A, Regis L, et al. A Clinically Significant Prostate Cancer Predictive Model Using Digital Rectal Examination Prostate Volume Category to Stratify Initial Prostate Cancer Suspicion and Reduce Magnetic Resonance Imaging Demand. *Cancers (Basel)*. 2022;14(20):5100.
16. Borque Á, Rubio-Briones J, Esteban LM, Sanz G, Domínguez-Escrig J, Ramírez-Backhaus M, et al. Implementing the use of nomograms by choosing threshold points in predictive models:

- 2012 updated Partin Tables vs a European predictive nomogram for organ-confined disease in prostate cancer. *BJU Int.* 2014;113(6):878–86.
17. Jiang S, Mo C, Guo S, Zhuang J, Huang B, Mao X. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived microRNA-205-containing exosomes impede the progression of prostate cancer through suppression of RHPN2. *Journal of experimental & clinical cancer research.* 2019;38(1):495–495.
 18. Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol (Dordr).* 2016;39(2):97–106.
 19. 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 ≤ 4.0 ng per Milliliter. *N Engl J Med.* 2004;350(22):2239–46.
 20. Adhyam M, Gupta AK. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian J Surg Oncol.* 2012;3(2):120–9.
 21. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer.* 2013;49(6):1374–403.
 22. Draisma G, Boer R, Otto SJ, van der Crujisen IW, Damhuis RAM, Schröder FH, et al. Lead Times and Overdetection Due to Prostate-Specific Antigen Screening: Estimates From the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 2003;95(12):868–78.
 23. Parker C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology.* 2015; 26 Suppl 5:v69-77.
 24. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93–9.
 25. Omri N, Kamil M, Alexander K, Alexander K, Edmond S, Ariel Z, et al. Association between PSA density and pathologically significant prostate cancer: The impact of prostate volume. *Prostate.* 2020;80(16):1444–9.
 26. Ito K, Yamamoto T, Ohi M, Kurokawa K, Suzuki K, Yamanaka H. Free/total PSA ratio is a powerful predictor of future prostate cancer morbidity in men with initial PSA levels of 4.1 to 10.0 ng/mL. *Urology.* 2003;61(4):760–4.
 27. Parker C, Castro E, Fizazi K, Heidenreich A, Ost P, Procopio G, et al. Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2020;31(9):1119–34.
 28. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Witterkind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* 8th ed. Union for International Cancer Control. 2016: 1–272.
 29. 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.

30. 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 Oncology*. 2007; 8(5):411-9.
31. Albertsen PC, Hanley JA, Gleason DF, Barry MJ. Competing Risk Analysis of Men Aged 55 to 74 Years at Diagnosis Managed Conservatively for Clinically Localized Prostate Cancer. *The journal of the American Medical Association*. 1998;280(11):975–80.
32. 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. *The journal of the American Medical Association*. 1998;280(11):969–74.
33. Cooperberg MR, Pasta DJ, Elkin EP, Litwin MS, Latini DM, Duchane J, et al. The University of California, San Francisco Cancer of the Prostate Risk Assessment score: A straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy. *Journal of Urology*. 2005;173(6):1938–42.
34. Preisser F, Cooperberg MR, Crook J, Feng F, Graefen M, Karakiewicz PI, et al. Intermediate-risk Prostate Cancer: Stratification and Management. *European urology oncology*. 2020; 3(3):270-280.
35. Mohler JL, Antonarakis ES, Armstrong AJ, D'Amico A V., Davis BJ, Dorff T, et al. Prostate cancer, version 2.2019. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2019;17(5):479–505.
36. Parry MG, Cowling TE, Sujenthiran A, Nossiter J, Berry B, Cathcart P, et al. Risk stratification for prostate cancer management: Value of the Cambridge Prognostic Group classification for assessing treatment allocation. *BMC Med*. 2020;18(1).
37. Cagney DN, Sul J, Huang RY, Ligon KL, Wen PY, Alexander BM. The FDA NIH Biomarkers, EndpointS, and other Tools (BEST) resource in neuro-oncology. *Neuro Oncol*. 2018;20(9):1162–72.
38. Wang S, Cowan JE, Cary KC, Chan JM, Carroll PR, Cooperberg MR. Limited ability of existing nomograms to predict outcomes in men undergoing active surveillance for prostate cancer. *BJU Int*. 2014;114(6b):E18–24.
39. Kretschmer A, Tilki D. Biomarkers in prostate cancer – Current clinical utility and future perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2017; 120:180-193.
40. Sheridan T, Herawi M, Epstein JI, Illei PB. The role of P501S and PSA in the diagnosis of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(9):1351–5.
41. Bernacki KD, Fields KL, Roh MH. The utility of PSMA and PSA immunohistochemistry in the cytologic diagnosis of metastatic prostate carcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2014;42(7):570–5.
42. Muniyan S, Chaturvedi NK, Dwyer JG, Lagrange CA, Chaney WG, Lin MF. Human prostatic acid phosphatase: structure, function and regulation. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):10438–64.
43. Gurel B, Ali TZ, Montgomery EA, Begum S, Hicks J, Goggins M, et al. NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1097–105.
44. Tan HL, Haffner MC, Esopi DM, Vaghasia AM, Giannico GA, Ross HM, et al. Prostate adenocarcinomas aberrantly expressing p63 are molecularly distinct from usual-type prostatic adenocarcinomas. *Modern pathology*. 2015;28(3):446–56.

45. Song C, Chen H. Predictive significance of TMRPSS2 - ERG fusion in prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int.* 2018;18(1):177–177.
46. Dabir PD, Ottosen P, Høyer S, Hamilton-Dutoit S. Comparative analysis of three- and two-antibody cocktails to AMACR and basal cell markers for the immunohistochemical diagnosis of prostate carcinoma. *Diagn Pathol.* 2012;7(1):81–81.
47. Trpkov K, Bartczak-Mckay J, Yilmaz A. Usefulness of Cytokeratin 5/6 and AMACR Applied as Double Sequential Immunostains for Diagnostic Assessment of Problematic Prostate Specimens. *Am J Clin Pathol.* 2009;132(2):211–20.
48. Leu CH, Yang ML, Chung NH, Huang YJ, Su YC, Chen YC, et al. Kallistatin ameliorates influenza virus pathogenesis by inhibition of kallikrein-related peptidase 1-mediated cleavage of viral hemagglutinin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(9):5619–30.
49. Tosoian JJ, Druskin SC, Andreas D, Mullane P, Chappidi M, Joo S, et al. Prostate Health Index density improves detection of clinically significant prostate cancer. *BJU Int.* 2017;120(6):793–8.
50. Stattin P, Vickers AJ, Sjöberg DD, Johansson R, Granfors T, Johansson M, et al. Improving the Specificity of Screening for Lethal Prostate Cancer Using Prostate-specific Antigen and a Panel of Kallikrein Markers: A Nested Case–Control Study. *Eur Urol.* 2015;68(2):207–13.
51. Nordström T, Vickers A, Assel M, Lilja H, Grönberg H, Eklund M. Comparison Between the Four-kallikrein Panel and Prostate Health Index for Predicting Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2014;68(1):139–46.
52. Heniks RJ, Leest MMG van der, Dijkstra S, Barentsz JO, Criekinge W van, Kaa CA van de, et al. A urinary biomarker-based risk score correlates with multiparametric MRI for prostate cancer detection. *Prostate.* 2017;77(14):1401–7.
53. Partin AW, van Neste L, Klein EA, Marks LS, Gee JR, Troyer DA, et al. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. *Journal of Urology.* 2014;192(4):1081–7.
54. Ploussard G, Durand X, Xylinas E, Moutereau S, Radulescu C, Forgue A, et al. Prostate Cancer Antigen 3 Score Accurately Predicts Tumour Volume and Might Help in Selecting Prostate Cancer Patients for Active Surveillance. *Eur Urol.* 2010;59(3):422–9.
55. Tomlins SA, Day JR, Lonigro RJ, Hovelson DH, Siddiqui J, Kunju LP, et al. Urine TMRPSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *Eur Urol.* 2015;70(1):45–53.
56. Donovan MJ, Noerholm M, Bentink S, Belzer S, Skog J, O'Neill V, et al. A molecular signature of PCA3 and ERG exosomal RNA from non-DRE urine is predictive of initial prostate biopsy result. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2015;18(4):370–5.
57. Abou El-Kasem F, Abulkheir I, Sidhom N, Ismail A, Habashy H, Elsayed H. 275. Role of immunohistochemical expression of AMACR as a prognostic and predictive biologic marker in advanced prostatic carcinoma. *European journal of surgical oncology.* 2016;42(9):S139–S139.
58. Chery L, Wright JL, Lin DW, Qu X, Fang M, Stanford J. PTEN loss in localized prostate cancer: clinicopathologic parameters and relationship with disease outcome. *J Urol.* 2014;191(4):e932–3.

59. Gerhardt J, Montani M, Wild P, Beer M, Huber F, Hermanns T, et al. FOXA1 Promotes Tumor Progression in Prostate Cancer and Represents a Novel Hallmark of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Am J Pathol.* 2012;180(2):848–61.
60. Luebke AM, Attarchi-Tehrani A, Meiners J, Hube-Magg C, Lang DS, Kluth M, et al. Loss of PSP94 expression is associated with early PSA recurrence and deteriorates outcome of PTEN deleted prostate cancers. *Cancer Biol Med.* 2019;16(2):319–30.
61. Gautam KA, Singh AN, Srivastav AN, Sankhwar SN. Angiogenesis in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia assessed by VEGF and CD-34 IHC: A comparative clinico-pathological study. *African journal of urology.* 2018;24(2):98–103.
62. Lee J, Kim SS. The function of p27KIP1 during tumor development. *Exp Mol Med.* 2009;41(11):765–71.
63. 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.
64. 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.
65. Cuzick J, Stone S, Fisher G, Yang ZH, North B v, Berney DM, et al. Validation of an RNA cell cycle progression score for predicting death from prostate cancer in a conservatively managed needle biopsy cohort. *Br J Cancer.* 2015;113(3):382–9.
66. Blume-Jensen P, Berman DM, Rimm DL, Shipitsin M, Putzi M, Nifong TP, et al. Biology of Human Tumors Development and clinical validation of an in situ biopsy-based multimarker assay for risk stratification in prostate cancer. *Clinical Cancer Research.* 2015;21(11):2591–600.
67. Karnes RJ, Choeurng V, Ross AE, Schaeffer EM, Klein EA, Freedland SJ, et al. Validation of a Genomic Risk Classifier to Predict Prostate Cancer-specific Mortality in Men with Adverse Pathologic Features. *Eur Urol.* 2017;73(2):168–75.
68. Huggins C, Hodges C v. Studies on Prostatic Cancer: I. The Effect of Castration, Of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *CA Cancer J Clin.* 1972;22(4):232–40.
69. Montgomery B, Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol.* 2009;6(2):76–85.
70. Gómez Rivas J, Fernández L, Abad-López P, Moreno-Sierra J. Androgen deprivation therapy in localized prostate cancer. Current status and future trends. *Actas Urológicas Espanolas (English ed).* 2023; 47(7):398-407.
71. Michaelson MD, Cotter SE, Gargollo PC, Zietman AL, Dahl DM, Smith MR. Management of Complications of Prostate Cancer Treatment. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(4):196–213.
72. Vanneste BGL, van Limbergen EJ, van Lin EN, van Roermund JGH, Lambin P. Prostate Cancer Radiation Therapy: What Do Clinicians Have to Know? *Biomed Res Int.* 2016;2016:6829875–14.
73. Gómez-Veiga F, Martínez-Breijo S, Solsona-Narbón E, Hernández C, Ciudin A, Ribal MJ, et al. Focal therapy for prostate cancer. Alternative treatment. *Actas urológicas españolas (English ed).* 2013;38(7):465–75.

74. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, de Santis M, et al. EAU–ESTRO–SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*. 2016;71(4):618–29.
75. Cunningham D, You Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods*. 2015;2(1):e17.
76. Serpa J. Tumor Microenvironment. Cham: Springer International Publishing. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2020.
77. Ahmad F, Cherukuri MK, Choyke PL. Metabolic reprogramming in prostate cancer. *British Journal of Cancer*. 2021;125(9):1185–1196.
78. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27–47.
79. Maan M, Peters JM, Dutta M, Patterson AD. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;504(3):582–9.
80. Bader DA, McGuire SE. Tumour metabolism and its unique properties in prostate adenocarcinoma. *Nat Rev Urol*. 2020;17(4):214–31.
81. Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep*. 1985;5(5):393–400.
82. vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (American Association for the Advancement of Science)*. 2009;324(5930):1029–33.
83. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*. 2009;8(23):3984–4001.
84. Zadra G, Photopoulos C, Loda M. The fat side of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831(10):1518–32.
85. Eidelman E, Twum-Ampofo J, Ansari J, Siddiqui MM. The metabolic phenotype of prostate cancer. *Frontiers in Oncology*. 2017;7:131.
86. Xu H, Chen Y, Gu M, Liu C, Chen Q, Zhan M, et al. Fatty acid metabolism reprogramming in advanced prostate cancer. *Metabolites*. 2021;11(11):765
87. Giunchi F, Fiorentino M, Loda M. The Metabolic Landscape of Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol*. 2019;2(1):28–36.
88. Researchers from University of Melbourne Discuss Findings in Prostate Cancer. Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2019;11(478):eaau5758
89. 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.
90. Jiramongkol Y, Lam EWF. Multifaceted Oncogenic Role of Adipocytes in the Tumour Microenvironment. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2020;1219:125–142.
91. 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):3823.

92. Hartley A, Ahmad I. The role of PPAR γ in prostate cancer development and progression. *Br J Cancer*. 2023;128(6):940–5.
93. Brown MD, Hart C, Gazi E, Gardner P, Lockyer N, Clarke N. Influence of omega-6 PUFA arachidonic acid and bone marrow adipocytes on metastatic spread from prostate cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(2):403-13.
94. Egnatchik RA, Leamy AK, Noguchi Y, Shiota M, Young JD. Palmitate-induced Activation of Mitochondrial Metabolism Promotes Oxidative Stress and Apoptosis in H4IIEC3 Rat Hepatocytes. *Metabolism*. 2014;63(2):283–95.
95. 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):31189-31197.
96. Mamouni K, Kallifatidis G, Lokeshwar BL. Targeting Mitochondrial Metabolism in Prostate Cancer with Triterpenoids. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2466.
97. 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.
98. Ettinger SL, Sobel R, Whitmore TG, Akbari M, Bradley DR, Gleave ME, Nelson CC. Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer Res*. 2004;64(6):2212-21.
99. 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. *Molecular Cancer Research*. 2012;10(1):133–42.
100. 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.
101. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metab*. 2013;18(2):153–61.
102. 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. *Molecular cancer research*. 2003;1(10):707–15.
103. 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.
104. Fiorentino M, Zadra G, Priolo C, Sharma C, Wanling XIE, Hemler ME, et al. Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of β -Catenin in prostate cancer. *Laboratory investigation*. 2008;88(12):1340–8.
105. 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.
106. Tamura K, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kobayashi T, Furihata M, Chung S, Ashida S, Miki T, Fujioka T, Shuin T, Nakamura Y, Nakagawa H. Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res*. 2009;69(20):8133-40.
107. Centenera MM, Scott JS, Machiels J, Nassar ZD, Miller DC, Zinonos I, Dehairs J, Burvenich IJG, Zadra G, Chetta PM, Bango C, Evergren E, Ryan NK, Gillis JL, Mah CY, Tieu T, Hanson

- AR, Carelli R, Bloch K, Panagopoulos V, Waelkens E, Derua R, Williams ED, Evdokiou A, Cifuentes-Rius A, Voelcker NH, Mills IG, Tilley WD, Scott AM, Loda M, Selth LA, Swinnen JV, Butler LM. ELOVL5 Is a Critical and Targetable Fatty Acid Elongase in Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2021;81(7):1704-1718.
108. Berquin IM, Edwards IJ, Kridel SJ, Chen YQ. Polyunsaturated fatty acid metabolism in prostate cancer. *Cancer and metastasis reviews.* 2011;30(3-4):295-309.
 109. Yang A, Mottillo EP. Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. *Biochemical journal.* 2020;477(5):985-1008.
 110. Liu R, Choi W, 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.
 111. 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;18(7):846-56.
 112. Liu Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2006;9(3):230-4.
 113. Zha S, Ferdinandusse S, Hicks JL, Denis S, Dunn TA, Wanders RJ, et al. Peroxisomal branched chain fatty acid β -oxidation pathway is upregulated in prostate cancer. *Prostate.* 2005;63(4):316-23.
 114. Flaig TW, Salzmann-Sullivan M, Su LJ, Zhang Z, Joshi M, Gijón MA, Kim J, Arcaroli JJ, Van Bokhoven A, Lucia MS, La Rosa FG, Schlaepfer IR. Lipid catabolism inhibits sensitizes prostate cancer cells to antiandrogen blockade. *Oncotarget.* 2017;8(34):56051-56065.
 115. 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.
 116. Heuer TS, Ventura R, Mordec K, Lai J, Fridlib M, Buckley D, et al. FASN Inhibition and Taxane Treatment Combine to Enhance Anti-tumor Efficacy in Diverse Xenograft Tumor Models through Disruption of Tubulin Palmitoylation and Microtubule Organization and FASN Inhibition-Mediated Effects on Oncogenic Signaling and Gene Expression. *EBioMedicine.* 2017;16:51-62.
 117. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS.* 2019;116(2):631-40.
 118. 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.
 119. Fidelito G, Watt MJ, Taylor RA. Personalized Medicine for Prostate Cancer: Is Targeting Metabolism a Reality? *Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.* 2022;11:778761.
 120. Falchook G, Infante J, Arkenau HT, Patel MR, Dean E, Borazanci E, et al. First-in-human study of the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of first-in-class fatty acid synthase inhibitor TVB-2640 alone and with a taxane in advanced tumors. *EClinicalMedicine.* 2021;34.
 121. Holubarsch CJF, Rohrbach M, Karrasch M, Boehm E, Polonski L, Ponikowski P, et al. A double-blind randomized multicentre clinical trial to evaluate the efficacy and safety of two doses of

- etomoxir in comparison with placebo in patients with moderate congestive heart failure: the ERGO (etomoxir for the recovery of glucose oxidation) study. *Clin Sci*. 2007;113(4):205–12.
122. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309–22.
123. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Current biology*. 2020;30(16):R921–5.
124. Jin MZ, Jin WL. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):166–166.
125. Tabuso M, Homer-Vanniasinkam S, Adya R, Arasaradnam RP. Role of tissue microenvironment resident adipocytes in colon cancer. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(32):5829–35.
126. Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(3):205–12.
127. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol*. 2020;4(1):459–77.
128. Sharonov G V, Serebrovskaya EO, Yuzhakova D V, Britanova O V, Chudakov DM. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(5):294–307.
129. Sobierajska K, Ciszewski WM, Sacewicz-Hofman I, Niewiarowska J. Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1234:71-86.
130. Hanoun M, Maryanovich M, Arnal-Estapé A, Frenette PS. Neural regulation of hematopoiesis, inflammation, and cancer. *Neuron*. 2015 Apr 22;86(2):360-73.
131. You H, Shang W, Min X, Weinreb J, Li Q, Leapman M, Wang L, Tian J. Sight and switch off: Nerve density visualization for interventions targeting nerves in prostate cancer. *Sci Adv*. 2020;6(6):eaax6040
132. Zahalka AH, Frenette PS. Nerves in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(3):143–57.
133. Coarfa C, Florentin D, Putluri N, Ding Y, Au J, He D, et al. Influence of the neural microenvironment on prostate cancer. *Prostate*. 2018;78(2):128–39.
134. Faulkner S, Jobling P, March B, Jiang CC, Hondermarck H. Tumor Neurobiology and the War of Nerves in Cancer. *Cancer Discov*. 2019;9(6):702–10.
135. Nagelkerke A, Bussink J, Rowan AE, Span PN. The mechanical microenvironment in cancer: How physics affects tumours. *Semin Cancer Biol*. 2015;35:62–70.
136. Razmkhah M, Jaberipour M, Erfani N, Habibagahi M, Talei A rasoul, Ghaderi A. Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- β 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: Do they protect breast cancer cells from the immune response? *Cell Immunol*. 2011;266(2):116–22.
137. Balaban S, Shearer RF, Lee LS, van Geldermalsen M, Schreuder M, Shtein HC, et al. Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer Metab*. 2017;5(1):1–1.
138. Munteanu R, Onaciu A, Moldovan C, Zimta AA, Gulei D, Paradiso AV, Lazar V, Berindan-Neagoe I. Adipocyte-Based Cell Therapy in Oncology: The Role of Cancer-Associated Adipocytes and Their Reinterpretation as Delivery Platforms. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):402

139. Wu Q, Li B, Li J, Sun S, Yuan J, Sun S. Cancer-associated adipocytes as immunomodulators in cancer. *Biomark Res.* 2021;9(1):1–21.
140. Filella X, Fernández-Galan E, Fernández Bonifacio R, Foj L. Emerging biomarkers in the diagnosis of prostate cancer. *Pharmgenomics Pers Med.* 2018;11:83–94.
141. Kiefer JA, Farach-Carson MC. Type I collagen-mediated proliferation of PC3 prostate carcinoma cell line: implications for enhanced growth in the bone microenvironment. *Matrix biology.* 2001;20(7):429–37.
142. Bussemakers MJG, Bokhoven A van, Tomita K, Jansen KFJ, Schalken JA. Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2000;85(3):446–50.
143. Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1298–327.
144. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(3):174–86.
145. Zhao R, Bei X, Yang B, Wang X, Jiang C, Shi F, et al. Endothelial cells promote metastasis of prostate cancer by enhancing autophagy. *Journal of experimental & clinical cancer research.* 2018;37(1):221–221.
146. Gurel B, Lucia MS, Thompson IM Jr, Goodman PJ, Tangen CM, Kristal AR, Parnes HL, Hoque A, Lippman SM, Sutcliffe S, Peskoe SB, Drake CG, Nelson WG, De Marzo AM, Platz EA. 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;23(5):847–56.
147. Shiao SL, Chu GCY, Chung LWK. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 2016;380(1):340–8.
148. Johansson A, Rudolfsson S, Hammarsten P, Halin S, Pietras K, Jones J, et al. Mast Cells Are Novel Independent Prognostic Markers in Prostate Cancer and Represent a Target for Therapy. *Am J Pathol.* 2010;177(2):1031–41.
149. Moldogazieva NT, Mokhosev IM, Mel'nikova TI, Porozov YB, Terentiev AA. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:3085756–14.
150. Davis JS, Nastiuk KL, Krolewski JJ. TNF Is Necessary for Castration-Induced Prostate Regression, Whereas TRAIL and FasL Are Dispensable. *Mol Endocrinol.* 2011;25(4):611–20.
151. Hu J, Nakano H, Sakurai H, Colburn NH. Insufficient p65 phosphorylation at S536 specifically contributes to the lack of NF-kappaB activation and transformation in resistant JB6 cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(10):1991–2003.
152. Yu S, Maynard JP, Vaghasia AM, De Marzo AM, Drake CG, Sfanos KS. A role for paracrine interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment in prostate tumor growth. *Prostate.* 2019;79(2):215–22.
153. Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, et al. Interleukin 8 Expression Regulates Tumorigenicity and Metastases in Androgen-independent Prostate Cancer. *Clinical cancer research.* 2000;6(5):2104–19.

154. Thobe MN, Clark RJ, Bainer RO, Prasad SM, Rinker-Schaeffer CW. From prostate to bone: key players in prostate cancer bone metastasis. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):478–93.
155. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(6):R187-204.
156. Bahmad HF, Jalloul M, Azar J, Moubarak MM, Samad TA, Mukherji D, Al-Sayegh M, Abou-Kheir W. Tumor Microenvironment in Prostate Cancer: Toward Identification of Novel Molecular Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, and Therapy Development. *Front Genet*. 2021;12:652747
157. Munteanu R, Onaciu A, Moldovan C, Zimta AA, Gulei D, Paradiso A V, et al. Adipocyte-Based Cell Therapy in Oncology: The Role of Cancer-Associated Adipocytes and Their Reinterpretation as Delivery Platforms. *Pharmaceutics*. 2020;12(5):402.
158. Sacca PA, Calvo JC. Periprostatic Adipose Tissue Microenvironment: Metabolic and Hormonal Pathways During Prostate Cancer Progression. *Front Endocrinol*. 2022;13:1–6.
159. Kahn CR, Wang G, Lee KY. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2019;129(10):3990–4000.
160. Suárez-Carmona W, Sánchez-Oliver AJ, González-Jurado JA. Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. *Revista Chilena de Nutricion*. 2017;44(3):226–33.
161. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
162. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*. 2009;79(4):235-44.
163. Cozzo AJ, Fuller AM, Makowski L. Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer. *Compr Physiol*. 2017;8(1):237-282.
164. Saha A, Kolonin MG, DiGiovanni J. Obesity and prostate cancer - microenvironmental roles of adipose tissue. *Nat Rev Urol*. 2023;20(10):579-596.
165. Pati S, Irfan W, Jameel A, Ahmed S, Shahid RK. Obesity and Cancer: A Current Overview of Epidemiology, Pathogenesis, Outcomes, and Management. *Cancers (Basel)*. 2023;15(2):485.
166. Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CSO, et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 2017;541(7635):41–5.
167. Masala G, Bendinelli B, Assedi M, Occhini D, Zanna I, Sieri S, et al. Up to one-third of breast cancer cases in post-menopausal Mediterranean women might be avoided by modifying lifestyle habits: the EPIC Italy study. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;161(2):311–20.
168. Amor S, Iglesias-de la Cruz MC, Ferrero E, García-Villar O, Barrios V, Fernandez N, et al. Peritumoral adipose tissue as a source of inflammatory and angiogenic factors in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2016;31(2):365–75.
169. Riondino S, Roselli M, Palmirota R, Della-Morte D, Ferroni P, Guadagni F. Obesity and colorectal cancer: Role of adipokines in tumor initiation and progression. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5177–90.
170. Aune D, Rosenblatt DAN, Chan DSM, Abar L, Vingeliene S, Vieira AR, et al. Anthropometric factors and ovarian cancer risk: A systematic review and nonlinear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*. 2015;136(8):1888–98.

171. Yang S, Wang H, Guo Y, Chen S, Zhang MY, Shen J, et al. RMP plays distinct roles in the proliferation of hepatocellular carcinoma cells and normal hepatic cells. *Int J Biol Sci.* 2013;9(6):637–48.
172. Brocco D, Florio R, De Lellis L, Veschi S, Grassadonia A, Tinari N, Cama A. The Role of Dysfunctional Adipose Tissue in Pancreatic Cancer: A Molecular Perspective. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1849.
173. Lo Iacono M, Modica C, Porcelli G, Brancato OR, Muratore G, Bianca P, Gaggianesi M, Turdo A, Veschi V, Todaro M, Di Franco S, Stassi G. Targeting of the Peritumoral Adipose Tissue Microenvironment as an Innovative Antitumor Therapeutic Strategy. *Biomolecules.* 2022;12(5):702.
174. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 2011;71(7):2455–65.
175. Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Seelaender M, Damaso AR, Oyama LM, et al. Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF- κ B pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine.* 2012;57(1):98–106.
176. Na H, Song Y, Lee HW. Emphasis on Adipocyte Transformation: Anti-Inflammatory Agents to Prevent the Development of Cancer-Associated Adipocytes. *Cancers (Basel).* 2023;15(2):502.
177. Wang F, Gao S, Chen F, Fu Z, Yin H, Lu X, et al. Mammary fat of breast cancer: Gene expression profiling and functional characterization. *PLoS One.* 2014;9(10).
178. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017;542(7640):177-185.
179. Pagnotta P, Gantov M, Fletcher S, Lombardi A, Crosbie ML, Santiso N, et al. Peritumoral adipose tissue promotes lipolysis and white adipocytes browning by paracrine action. *Front Endocrinol.* 2023;14.
180. Gnerlich JL, Yao KA, Fitchev PS, Goldschmidt RA, Bond MC, Cornwell M, Crawford SE. Peritumoral expression of adipokines and fatty acids in breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013;20 Suppl 3:S731-8.
181. Choi J, Cha YJ, Koo JS. Adipocyte biology in breast cancer: From silent bystander to active facilitator. *Prog Lipid Res.* 2018;69:11-20.
182. Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, et al. Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1163–76.
183. Bochet L, Lehuédé C, Dauvillier S, Wang YY, Dirat B, Laurent V, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 2013;73(18):5657–68.
184. Zazo S, González-Alonso P, Martín-Aparicio E, Chamizo C, Luque M, Sanz-Álvarez M, et al. Autocrine CCL5 effect mediates trastuzumab resistance by ERK pathway activation in HER2-positive breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(8):1696–707.
185. Bochet L, Meulle A, Imbert S, Salles B, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(1):102–6.

186. Nieman KM, Kenny HA, Penicka C V, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011;17(11):1498–503.
187. Chehade H, Tedja R, Ramos H, Bawa TS, Adzibololu N, Gogoi R, Mor G, Alvero AB. Regulatory Role of the Adipose Microenvironment on Ovarian Cancer Progression. *Cancers (Basel).* 2022;14(9):2267.
188. Dai L, Song K, Di W. Adipocytes: active facilitators in epithelial ovarian cancer progression? *J Ovarian Res.* 2020;13(1):115.
189. Chen C, Chang YC, Lan MS, Breslin M. Leptin stimulates ovarian cancer cell growth and inhibits apoptosis by increasing cyclin D1 and Mcl-1 expression via the activation of the MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol.* 2013;42(3):1113–9.
190. Zinngrebe J, Debatin KM, Fischer-Posovszky P. Adipocytes in hematopoiesis and acute leukemia: friends, enemies, or innocent bystanders? *Leukemia.* 2020;34(9):2305-2316.
191. Woolthuis CM, Stranahan AW, Park CY, Minhajuddin M, Gasparetto M, Stevens B, et al. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell.* 2016;19(1):23–37.
192. Sheng X, Parmentier JH, Tucci J, Pei H, Cortez-Toledo O, Dieli-Conwright CM, et al. Adipocytes sequester and metabolize the chemotherapeutic daunorubicin. *Molecular Cancer Research.* 2017;15(12):1704–13.
193. Olszańska J, Pietraszek-Gremplewicz K, Nowak D. Melanoma Progression under Obesity: Focus on Adipokines. *Cancers (Basel).* 2021;13(9):2281.
194. Jung JI, Cho HJ, Jung YJ, Kwon SH, Her S, Choi SS, et al. High-fat diet-induced obesity increases lymphangiogenesis and lymph node metastasis in the B16F10 melanoma allograft model: Roles of adipocytes and M2-macrophages. *Int J Cancer.* 2015;136(2):258–70.
195. Rios-Colon L, Arthur E, Niture S, Qi Q, Moore JT, Kumar D. The Role of Exosomes in the Crosstalk between Adipocytes and Liver Cancer Cells. *Cells.* 2020;9(9):1988.
196. Gomes AL, Teijeiro A, Burén S, Tummala KS, Yilmaz M, Waisman A, et al. Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell.* 2016;30(1):161–75.
197. Jamieson NB, Foulis AK, Oien KA, Dickson EJ, Imrie CW, Carter R, et al. Peripancreatic Fat Invasion Is an Independent Predictor of Poor Outcome Following Pancreaticoduodenectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Surgery.* 2011;15(3):512–24.
198. Eibl G, Rozengurt E. Obesity and Pancreatic Cancer: Insight into Mechanisms. *Cancers (Basel).* 2021;13(20):5067.
199. Meyer KA, Neeley CK, Baker NA, Washabaugh AR, Flesher CG, Nelson BS, Frankel TL, Lumeng CN, Lyssiotis CA, Wynn ML, Rhim AD, O'Rourke RW. Adipocytes promote pancreatic cancer cell proliferation via glutamine transfer. *Biochem Biophys Rep.* 2016;7:144-149.
200. Conti G, Calderan L, Quintero Sierra LA, Conti A, Ossanna R, Boschi F, et al. Tumor and peritumoral adipose tissue crosstalk: De-differentiated adipocytes influence spread of colon carcinoma cells. *Tissue Cell.* 2023;80.

201. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
202. Huang XF, Chen JZ. Obesity, the PI3K/Akt signal pathway and colon cancer. *Obes Rev*. 2009;10(6):610-6.
203. Xiang F, Wu K, Liu Y, Shi L, Wang D, Li G, et al. Omental adipocytes enhance the invasiveness of gastric cancer cells by oleic acid-induced activation of the PI3K-Akt signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;84:14–21.
204. O'Sullivan J, Lysaght J, Donohoe CL, Reynolds JV. Obesity and gastrointestinal cancer: the interrelationship of adipose and tumour microenvironments. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(11):699-714.
205. Reseland JE, Reppe S, Olstad OK, Hjorth-Hansen H, Brenne AT, Syversen U, et al. Abnormal adipokine levels and leptin-induced changes in gene expression profiles in multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2009;83(5):460–70.
206. Allegra A, Innao V, Gerace D, Allegra AG, Vaddinelli D, Bianco O, Musolino C. The adipose organ and multiple myeloma: Impact of adipokines on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Eur J Intern Med*. 2018;53:12-20.
207. Latif T, Chauhan N, Khan R, Moran A, Usmani SZ. Thalidomide and its analogues in the treatment of Multiple Myeloma. *Exp Hematol Oncol*. 2012;1(1):27.
208. Standal T, Borset M, Lenhoff S, Wisloff F, Stordal B, Sundan A, et al. Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*. 2002;100(12):3925–9.
209. Dumas JF, Brisson L. Interaction between adipose tissue and cancer cells: role for cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2021;40(1):31–46.
210. Hong H, Koch MO, Foster RS, Bihrlé R, Gardner TA, Fyffe J, Ulbright TM, Eble JN, Cheng L. Anatomic distribution of periprostatic adipose tissue: a mapping study of 100 radical prostatectomy specimens. *Cancer*. 2003;97(7):1639-43.
211. Roumiguié M, Estève D, Manceau C, Toulet A, Gilleron J, Belles C, et al. Periprostatic Adipose Tissue Displays a Chronic Hypoxic State that Limits Its Expandability. *Am J Pathol*. 2022;192(6):926–42.
212. 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(20):2345–55.
213. Finley DS, Calvert VS, Inokuchi J, Lau A, Narula N, Petricoin EF, et al. Periprostatic Adipose Tissue as a Modulator of Prostate Cancer Aggressiveness. *J Urol*. 2009;182(4):1621–7.
214. Liotti A, La Civita E, Cennamo M, Crocetto F, Ferro M, Guadagno E, et al. Periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer resistance to docetaxel by paracrine IGF-1 upregulation of TUBB2B beta-tubulin isoform. *Prostate*. 2021;81(7):407–17.
215. Laurent V, Guérard A, Mazerolles C, Le Gonidec S, Toulet A, Nieto L, et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat Commun*. 2016;7.

216. Ribeiro R, Monteiro C, Silvestre R, Castela Â, Coutinho H, Fraga A, et al. Human periprostatic white adipose tissue is rich in stromal progenitor cells and a potential source of prostate tumor stroma. *Exp Biol Med*. 2012;237(10):1155–62.
217. Arai S, Shibata Y, Koike H, Matsui H, Ito K, Seiji Honma J, et al. Androgen production in periprostatic adipose tissue in prostate cancer patients. *The Journal of Urology*. 2012;187(4):e389-e390.
218. Laurent V, Toulet A, Attané C, Milhas D, Dauvillier S, Zaidi F, et al. Periprostatic adipose tissue favors prostate cancer cell invasion in an obesity-dependent manner: Role of oxidative stress. *Molecular Cancer Research*. 2019;17(3):821–35.
219. Sacca PA, Mazza ON, Scorticati C, Vitagliano G, Casas G, Calvo JC. Human periprostatic adipose tissue: Secretome from patients with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019;16(1):29–58.
220. Roermund JGH van, Hinnen KA, Tolman CJ, Bol GH, Witjes JA, Bosch JLHR, et al. Periprostatic fat correlates with tumour aggressiveness in prostate cancer patients. *BJU Int*. 2011;107(11):1775–9.
221. Bhindi B, Trottier G, Elharram M, Fernandes KA, Lockwood G, Toi A, et al. Measurement of peri-prostatic fat thickness using transrectal ultrasonography (TRUS): A new risk factor for prostate cancer. *BJU Int*. 2012;110(7):980–6.
222. Woo S, Cho JY, Kim SY, Kim SH. Periprostatic fat thickness on MRI: correlation with Gleason score in prostate cancer. *American journal of roentgenology*. 2015;204(1):W43–7.
223. Dahran N, Szewczyk-Bieda M, Wei C, Vinnicombe S, Nabi G. Normalized periprostatic fat MRI measurements can predict prostate cancer aggressiveness in men undergoing radical prostatectomy for clinically localised disease article. *Sci Rep*. 2017;7(1).
224. Salji M, Hendry J, Patel A, Ahmad I, Nixon C, Leung HY. Peri-prostatic Fat Volume Measurement as a Predictive Tool for Castration Resistance in Advanced Prostate Cancer. *Eur Urol Focus*. 2018;4(6):858–66.
225. Huang H, Chen S, Li W, Bai P, Wu X, Xing J. Periprostatic Fat Thickness on MRI is an Independent Predictor of Time to Castration-resistant Prostate Cancer in Chinese Patients With Newly Diagnosed Prostate Cancer Treated With Androgen Deprivation Therapy. *Clin Genitourin Cancer*. 2019;17(5):e1036–47.
226. Vertulli D, Santucci D, Esperto F, Beomonte Zobel B, Grasso RF, Faiella E. Impact of adipose tissue distribution on prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *Actas Urol Esp*. 2023;47(2):104–10.
227. Di Bella CM, Howard LE, Oyekunle T, De Hoedt AM, Salama JK, Song H, et al. Abdominal and pelvic adipose tissue distribution and risk of prostate cancer recurrence after radiation therapy. *Prostate*. 2020;80(14):1244–52.
228. Sasaki T, Sugino Y, Kato M, Nishikawa K, Kanda H. Pre-treatment ratio of periprostatic to subcutaneous fat thickness on MRI is an independent survival predictor in hormone-naïve men with advanced prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. 2020;25(2):370–6.
229. Iemura Y, Hori S, Tatsumi Y, Fukui S, Miyake M, Matsumura Y, et al. Periprostatic fat thickness quantified by preoperative magnetic resonance imaging is an independent risk factor for upstaging from cT1/2 to pT3 in robot-assisted radical prostatectomy. *International Journal of Urology*. 2020;27(12):1144–9.

230. Gregg JR, Surasi DS, Childs A, Moll N, Ward JF, Kim J, et al. The Association of Periprostatic Fat and Grade Group Progression in Men with Localized Prostate Cancer on Active Surveillance. *J Urol.* 2021;205(1):122–8.
231. Xiong T, Cao F, Zhu G, Ye X, Cui Y, Xing N, et al. MRI-measured periprostatic adipose tissue volume as a prognostic predictor in prostate cancer patients undergoing laparoscopic radical prostatectomy. *Adipocyte.* 2023;12(1).
232. Nomura AM. Body size and prostate cancer. *Epidemiol Rev.* 2001;23(1):126-31.
233. Porter MP, Stanford JL. Obesity and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 2005;62(4):316–21.
234. Rodriguez C, Freedland SJ, Deka A, Jacobs EJ, McCullough ML, Patel A V., et al. Body mass index, weight change, and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 2007;16(1):63–9.
235. Wright ME, Chang SC, Schatzkin A, Albanes D, Kipnis V, Mouw T, et al. Prospective study of adiposity and weight change in relation to prostate cancer incidence and mortality. *Cancer.* 2007;109(4):675–84.
236. Bassett JK, Severi G, Baglietto L, MacInnis RJ, Hoang HN, Hopper JL, et al. Weight change and prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer.* 2012;131(7):1711–9.
237. Perez-Cornago A, Dunneram Y, Watts EL, Key TJ, Travis RC. Adiposity and risk of prostate cancer death: a prospective analysis in UK Biobank and meta-analysis of published studies. *BMC Med.* 2022;20(1).
238. Jochems SHJ, Stattin P, Häggström C, Järnholm B, Orho-Melander M, Wood AM, et al. Height, body mass index and prostate cancer risk and mortality by way of detection and cancer risk category. *Int J Cancer.* 2020;147(12):3328–38.
239. Huang J, Duran A, Reina-Campos M, Valencia T, Castilla EA, Müller TD, et al. Adipocyte p62/SQSTM1 Suppresses Tumorigenesis through Opposite Regulations of Metabolism in Adipose Tissue and Tumor. *Cancer Cell.* 2018;33(4):770-784.e6.
240. Ribeiro R, Monteiro C, Catalán V, Hu P, Cunha V, Rodríguez A, et al. Obesity and prostate cancer: gene expression signature of human periprostatic adipose tissue. *BMC Med.* 2012;10(1):108–108.
241. Ribeiro R, Monteiro C, Cunha V, Oliveira MJ, Freitas M, Fraga A, et al. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *Journal of experimental & clinical cancer research.* 2012;31(1):32–32.
242. Zhang T, Tseng C, Zhang Y, Sirin O, Corn PG, Li-Ning-Tapia EM, et al. CXCL1 mediates obesity-associated adipose stromal cell trafficking and function in the tumour microenvironment. *Nat Commun.* 2016;7(1):11674–11674.
243. Adekoya TO, Richardson RM. Cytokines and Chemokines as Mediators of Prostate Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4449.
244. Gucalp A, Iyengar NM, Zhou XK, Giri DD, Falcone DJ, Wang H, et al. Periprostatic adipose inflammation is associated with high-grade prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017;20(4):418–23.
245. Rivera-Izquierdo M, Pérez de Rojas J, Martínez-Ruiz V, Arrabal-Polo MÁ, Pérez-Gómez B, Jiménez-Moleón JJ. Obesity and biochemical recurrence in clinically localised prostate cancer:

- a systematic review and meta-analysis of 86,490 patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2022;25(3):411–21.
246. Nassar ZD, Aref AT, Miladinovic D, Mah CY, Raj GV, Hoy AJ, Butler LM. Peri-prostatic adipose tissue: the metabolic microenvironment of prostate cancer. *BJU Int.* 2018;121 Suppl 3:9-21.
247. Crowe FL, Appleby PN, Travis RC, Barnett M, Brasky TM, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Circulating fatty acids and prostate cancer risk: individual participant meta-analysis of prospective studies. *JNCI : Journal of the National Cancer Institute.* 2014;106(9):1.
248. Careaga VP, Sacca PA, Mazza ON, Scorticati C, Vitagliano G, Fletcher SJ, et al. Fatty Acid Composition of Human Periprostatic Adipose Tissue from Argentine Patients and Its Relationship to Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia. *Research In Cancer and Tumor.* 2015;2015(1):1–6.
249. Iordanescu G, Brendler C, Crawford SE, Wyrwicz AM, Venkatasubramanian PN, Doll JA. MRS measured fatty acid composition of periprostatic adipose tissue correlates with pathological measures of prostate cancer aggressiveness. *Journal of magnetic resonance imaging.* 2015;42(3):651–7.
250. Figiel S, Pinault M, Domingo I, Guimaraes C, Guibon R, Besson P, et al. Fatty acid profile in peri-prostatic adipose tissue and prostate cancer aggressiveness in African–Caribbean and Caucasian patients. *European journal of cancer.* 2018;91:107–15.
251. Allott EH, Arab L, Su LJ, Farnan L, Fontham ETH, Mohler JL, et al. Saturated fat intake and prostate cancer aggressiveness: results from the population-based North Carolina-Louisiana Prostate Cancer Project. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017;20(1):48–54.
252. Miladinovic D, Cusick T, Mahon KL, Haynes AM, Cortie CH, Meyer BJ, et al. Assessment of Periprostatic and Subcutaneous Adipose Tissue Lipolysis and Adipocyte Size from Men with Localized Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(6):1385.
253. Mamalakis G, Kafatos A, Kalogeropoulos N, Andrikopoulos N, Daskalopoulos G, Kranidis A. Prostate cancer vs hyperplasia: relationships with prostatic and adipose tissue fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(5-6):467-77.
254. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269-88.
255. Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2023;23(4):236-250.
256. Salomon C, Das S, Erdbrügger U, Kalluri R, Kiang Lim S, Olefsky JM, Rice GE, Sahoo S, Andy Tao W, Vader P, Wang Q, Weaver AM. Extracellular Vesicles and Their Emerging Roles as Cellular Messengers in Endocrinology: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev.* 2022;43(3):441-468.
257. Amarasinghe I, Phillips W, Hill AF, Cheng L, Helbig KJ, Willms E, et al. Cellular communication through extracellular vesicles and lipid droplets. *Journal of Extracellular Biology.* 2023;2(3).
258. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1163-72.
259. Lopatina T, Bruno S, Tetta C, Kalinina N, Porta M, Camussi G. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell Commun Signal.* 2014;12:26.

260. Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringnér M, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(18):7312–7.
261. Hosseinkhani B, van den Akker NMS, Molin DGM, Michiels L. (Sub)populations of extracellular vesicles released by TNF- α –triggered human endothelial cells promote vascular inflammation and monocyte migration. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1).
262. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478).
263. Vlaeminck-Guillem V. Extracellular vesicles in prostate cancer carcinogenesis, diagnosis, and management. *Front Oncol*. 2018;8.
264. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:41-51.
265. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789-804.
266. 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;7(1).
267. French KC, Antonyak MA, Cerione RA. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;67:48-55.
268. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.
269. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-228.
270. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*. 2009;9(21):4997–5000.
271. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12).
272. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer*. 2019;18(1):75.
273. 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.
274. Record M, Silvente-Poirot S, Poirot M, Wakelam MJO. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lipid Res*. 2018;59(8):1316-1324.
275. Boilard E. Extracellular vesicles and their content in bioactive lipid mediators: more than a sack of microRNA. *J Lipid Res*. 2018;59(11):2037-2046.
276. Turchinovich A, Drapkina O, Tonevitsky A. Transcriptome of extracellular vesicles: State-of-the-art. *Front Immunol*. 2019;10.

277. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvalld JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654–9.
278. Rodosthenous RS, Hutchins E, Reiman R, Yeri AS, Srinivasan S, Whitsett TG, et al. Profiling Extracellular Long RNA Transcriptome in Human Plasma and Extracellular Vesicles for Biomarker Discovery. *iScience.* 2020;23(6).
279. Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(8):622–38.
280. Zheng C, Xie L, Qin H, Liu X, Chen X, Lv F, Wang L, Zhu X, Xu J. The Role of Extracellular Vesicles in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:835566.
281. Moraes JA, Encarnação C, Franco VA, Botelho LGX, Rodrigues GP, Ramos-Andrade I, et al. Adipose tissue-derived extracellular vesicles and the tumor microenvironment: Revisiting the hallmarks of cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(13):1–23.
282. Wang S, Su X, Xu M, Xiao X, Li X, Li H, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stromal/stem cell-derived adipocytes promote breast cancer cell growth via activation of Hippo signaling pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1).
283. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *Journal of Experimental Medicine.* 2002;195(10):1303–16.
284. Li Y, Tang X, Gu Y, Zhou G. Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles: Small Vesicles with Big Impact. *Frontiers in Bioscience - Landmark.* 2023;28(7).
285. Wang Y, Chu Y, Li K, Zhang G, Guo Z, Wu X, et al. Exosomes Secreted by Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Foster Metastasis and Osteosarcoma Proliferation by Increasing COLGALT2 Expression. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8.
286. Jeurissen S, Vergauwen G, Van Deun J, Lapeire L, Depoorter V, Miinalainen I, et al. The isolation of morphologically intact and biologically active extracellular vesicles from the secretome of cancer-associated adipose tissue. *Cell Adh Migr.* 2017;11(2):196–204.
287. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 2005;113(5):752–60.
288. Wu L, Zhang X, Zhang B, Shi H, Yuan X, Sun Y, et al. Exosomes derived from gastric cancer cells activate NF- κ B pathway in macrophages to promote cancer progression. *Tumor Biology.* 2016;37(9):12169–80.
289. Goulet CR, Champagne A, Bernard G, Vandal D, Chabaud S, Pouliot F, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC Cancer.* 2019;19(1).
290. Gangadaran P, Rajendran RL, Oh JM, Oh EJ, Hong CM, Chung HY, et al. Identification of angiogenic cargo in extracellular vesicles secreted from human adipose tissue-derived stem cells and induction of angiogenesis in vitro and in vivo. *Pharmaceutics.* 2021;13(4).
291. Hood JL, San Roman S, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 2011;71(11):3792–801.

292. Sun X, Ma X, Wang J, Zhao Y, Wang Y, Bihl JC, et al. Glioma stem cells-derived exosomes promote the angiogenic ability of endothelial cells through miR-21/VEGF signal. 2017;8(22):36137-36148.
293. Khanh VC, Fukushige M, Moriguchi K, Yamashita T, Osaka M, Hiramatsu Y, et al. Type 2 Diabetes Mellitus Induced Paracrine Effects on Breast Cancer Metastasis through Extracellular Vesicles Derived from Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2020;29(21):1382–94.
294. Lin R, Wang S, Zhao RC. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Mol Cell Biochem.* 2013;383(1–2):13–20.
295. Wu S, Wang Y, Yuan Z, Wang S, Du H, Liu X, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells promote breast cancer MCF7 cell epithelial-mesenchymal transition by cross interacting with the TGF- β /Smad and PI3K/AKT signaling pathways. *Mol Med Rep.* 2019;19(1):177–86.
296. Lazar I, Clement E, Dauvillier S, Milhas D, Ducoux-Petit M, LeGonidec S, et al. Adipocyte Exosomes Promote Melanoma Aggressiveness through Fatty Acid Oxidation: A Novel Mechanism Linking Obesity and Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(14):4051–7.
297. Clement E, Lazar I, Attané C, Carrié L, Dauvillier S, Ducoux-Petit M, et al. Adipocyte extracellular vesicles carry enzymes and fatty acids that stimulate mitochondrial metabolism and remodeling in tumor cells. *EMBO J.* 2020;39(3).
298. Wang J, Wu Y, Guo J, Fei X, Yu L, Ma S. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(47):81880-81891.
299. Hu W, Ru Z, Zhou Y, Xiao W, Sun R, Zhang S, et al. Lung cancer-derived extracellular vesicles induced myotube atrophy and adipocyte lipolysis via the extracellular IL-6-mediated STAT3 pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019;1864(8):1091–102.
300. Gutkin A, Uziel O, Beery E, Nordenberg J, Pinchasi M, Goldvaser H, et al. Tumor cells derived exosomes contain hTERT mRNA and transform nonmalignant fibroblasts into telomerase positive cells. 2016;7(37):59173-59188.
301. Ren H, Zhao T, Wang X, Gao C, Wang J, Yu M, et al. Leptin upregulates telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(1):59–63.
302. Gernapudi R, Yao Y, Zhang Y, Wolfson B, Roy S, Duru N, et al. Targeting exosomes from preadipocytes inhibits preadipocyte to cancer stem cell signaling in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;150(3):685–95.
303. Zhao H, Shang Q, Pan Z, Bai Y, Li Z, Zhang H, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells attenuate adipose inflammation and obesity through polarizing M2 macrophages and beiging in white adipose tissue. *Diabetes.* 2018;67(2):235–47.
304. Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Álvarez V, Tarazona R, et al. Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Front Immunol.* 2014;5.
305. Wang S, Xu M, Li X, Su X, Xiao X, Keating A, et al. Exosomes released by hepatocarcinoma cells endow adipocytes with tumor-promoting properties. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):1–14.

306. Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production. *The Journal of Immunology*. 2011;187(2):676–83.
307. Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*. 2015;34(3):319–33.
308. Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget*. 2015;6(2):715–31.
309. Salimu J, Webber J, Gurney M, Al-Taei S, Clayton A, Tabi Z. Dominant immunosuppression of dendritic cell function by prostate-cancer-derived exosomes. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1).
310. Elmageed ZYA, Yang Y, Thomas R, Ranjan M, Mondal D, Moroz K, et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells*. 2014;32(4):983–97.
311. Lin LC, Gao AC, Lai CH, Hsieh JT, Lin H. Induction of neuroendocrine differentiation in castration resistant prostate cancer cells by adipocyte differentiation-related protein (ADRP) delivered by exosomes. *Cancer Lett*. 2017;391:74–82.
312. Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(2):169–73.
313. Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, et al. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: A role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res*. 2009;69(3):785–93.
314. Fontana F, Anselmi M, Carollo E, Sartori P, Procacci P, Carter D, et al. Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles Promote Prostate Cancer Cell Aggressiveness by Enabling Multiple Phenotypic and Metabolic Changes. *Cells*. 2022;11(15).
315. Mathiesen A, Haynes B, Huyck R, Brown M, Dobrian A. Adipose Tissue-Derived Extracellular Vesicles Contribute to Phenotypic Plasticity of Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2).
316. Morhayim J, Van De Peppel J, Demmers JAA, Kocer G, Nigg AL, Van Driel M, et al. Proteomic signatures of extracellular vesicles secreted by nonmineralizing and mineralizing human osteoblasts and stimulation of tumor cell growth. *FASEB Journal*. 2015;29(1):274–85.
317. Duan W, Du L, Jiang X, Wang R, Yan S, Xie Y, Yan K, Wang Q, Wang L, Zhang X, Pan H, Yang Y, Wang C. Identification of a serum circulating lncRNA panel for the diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Oncotarget*. 2016;7(48):78850–78858.
318. Berrondo C, Flax J, Kucherov V, Siebert A, Osinski T, Rosenberg A, et al. Expression of the long non-coding RNA HOTAIR correlates with disease progression in bladder cancer and is contained in bladder cancer patient urinary exosomes. *PLoS One*. 2016;11(1).
319. Zhang R, Xia Y, Wang Z, Zheng J, Chen Y, Li X, et al. Serum long non coding RNA MALAT-1 protected by exosomes is up-regulated and promotes cell proliferation and migration in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;490(2):406–14.
320. Zhang Y, Liu YT, Tang H, Xie WQ, Yao H, Gu WT, et al. Exosome-Transmitted lncRNA H19 Inhibits the Growth of Pituitary Adenoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2019;104(12):6345–56.

321. Lin Y, Dong H, Deng W, Lin W, Li K, Xiong X, et al. Evaluation of salivary exosomal chimeric GOLM1-NAA35 RNA as a potential biomarker in esophageal carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(10):3035–45.
322. 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;17(1):128.
323. Yang S, Che SPY, Kurywchak P, Tavormina JL, Gansmo LB, Correa de Sampaio P, et al. Detection of mutant KRAS and TP53 DNA in circulating exosomes from healthy individuals and patients with pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*. 2017;18(3):158–65.
324. Keserű JS, Soltész B, Lukács J, Márton É, Szilágyi-Bónizs M, Penyige A, et al. Detection of cell-free, exosomal and whole blood mitochondrial DNA copy number in plasma or whole blood of patients with serous epithelial ovarian cancer. *J Biotechnol*. 2019;298:76–81.
325. Li Y, Zhang Y, Qiu F, Qiu Z. Proteomic identification of exosomal LRG1: A potential urinary biomarker for detecting NSCLC. *Electrophoresis*. 2011;32(15):1976–83.
326. Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, Theodorescu D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res*. 2008;7(5):2088–96.
327. Welton JL, Khanna S, Giles PJ, Brennan P, Brewis IA, Staffurth J, et al. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2010;9(6):1324–38.
328. Raimondo F, Morosi L, Corbetta S, Chinello C, Brambilla P, Della Mina P, et al. Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes. *Mol Biosyst*. 2013;9(6):1220–33.
329. Houali K, Wang X, Shimizu Y, Djennaoui D, Nicholls J, Fiorini S, et al. A new diagnostic marker for secreted Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and BARP1 oncoproteins in the serum and saliva of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(17):4993–5000.
330. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One*. 2009;4(4).
331. Zhang P, Zhou X, He M, Shang Y, Tetlow AL, Godwin AK, et al. Ultrasensitive detection of circulating exosomes with a 3D-nanopatterned microfluidic chip. *Nat Biomed Eng*. 2019;3(6):438–51.
332. Sherman-Samis M, Onallah H, Holth A, Reich R, Davidson B. SOX2 and SOX9 are markers of clinically aggressive disease in metastatic high-grade serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2019;153(3):651–60.
333. Runz S, Keller S, Rupp C, Stoeck A, Issa Y, Koensgen D, et al. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol Oncol*. 2007;107(3):563–71.
334. Szajnik M, Derbis M, Lach M, Patalas P, Michalak M, Drzewiecka H, Szpurek D, Nowakowski A, Spaczynski M, Baranowski W, Whiteside TL. Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy. *Gynecol Obstet (Sunnyvale)*. 2013;Suppl 4:3.
335. Moon PG, Lee JE, Cho YE, Lee SJ, Chae YS, Jung JH, Kim IS, Park HY, Baek MC. Fibronectin on circulating extracellular vesicles as a liquid biopsy to detect breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(26):40189–40199.

336. Dorayappan KDP, Gardner ML, Hisey CL, Zingarelli RA, Smith BQ, Lightfoot MDS, et al. A microfluidic chip enables isolation of exosomes and establishment of their protein profiles and associated signaling pathways in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2019;79(13):3503–13.
337. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature.* 2015;523(7559):177–82.
338. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med.* 1998;4(5):594-600.
339. Escudier B, Dorval T, Chaput N, André F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulleire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E, Zitvogel L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med.* 2005;3(1):10.
340. Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med.* 2005;3.
341. Näslund TI, Gehrman U, Qazi KR, Karlsson MCI, Gabrielsson S. Dendritic Cell-Derived Exosomes Need To Activate Both T and B Cells To Induce Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology.* 2013;190(6):2712–9.
342. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - An ISEV position paper. *J Extracell Vesicles.* 2015;4(1).
343. Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Molecular Therapy.* 2008;16(4):782–90.
344. EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(5):347-57.
345. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells.* 2019;8(4):307.
346. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy.* 2010;18(9):1606–14.
347. Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett.* 2016;371(1):48–61.
348. Kim MS, Haney MJ, Zhao Y, Mahajan V, Deygen I, Klyachko NL, et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine.* 2016;12(3):655–64.
349. Logozzi M, Mizzoni D, Di Raimo R, Giuliani A, Maggi M, Sciarra A, et al. Plasmatic Exosome Number and Size Distinguish Prostate Cancer Patients From Healthy Individuals: A Prospective Clinical Study. *Front Oncol.* 2021;11.
350. Logozzi M, Angelini DF, Giuliani A, Mizzoni D, Raimo R Di, Maggi M, et al. Increased plasmatic levels of psa-expressing exosomes distinguish prostate cancer patients from benign prostatic hyperplasia: A prospective study. *Cancers (Basel).* 2019;11(10).

351. Logozzi M, Mizzoni D, Capasso C, Del Prete S, Di Raimo R, Falchi M, et al. Plasmatic exosomes from prostate cancer patients show increased carbonic anhydrase IX expression and activity and low pH. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020;35(1):280–8.
352. Ramirez-Garrastacho M, Bajo-Santos C, Line A, Martens-Uzunova ES, de la Fuente JM, Moros M, Soekmadji C, Tasken KA, Llorente A. Extracellular vesicles as a source of prostate cancer biomarkers in liquid biopsies: a decade of research. *Br J Cancer.* 2022;126(3):331-350.
353. Cho S, Yang HC, Rhee WJ. Simultaneous multiplexed detection of exosomal microRNAs and surface proteins for prostate cancer diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2019;146.
354. Wang Y, Li Q, Shi H, Tang K, Qiao L, Yu G, et al. Microfluidic Raman biochip detection of exosomes: A promising tool for prostate cancer diagnosis. *Lab Chip.* 2020;20(24):4632–7.
355. Han Q, Xie QR, Li F, Cheng Y, Wu T, Zhang Y, et al. Targeted inhibition of SIRT6 via engineered exosomes impairs tumorigenesis and metastasis in prostate cancer. *Theranostics.* 2021;11(13):6526–41.
356. Krishn SR, Garcia V, Naranjo NM, Quaglia F, Shields CD, Harris MA, et al. Small extracellular vesicle-mediated ITGB6 siRNA delivery downregulates the α V β 6 integrin and inhibits adhesion and migration of recipient prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2022;23(1):173–85.
357. Saari H, Lázaro-Ibáñez E, Viitala T, Vuorimaa-Laukkanen E, Siljander P, Yliperttula M. Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. *Journal of Controlled Release.* 2015;220:727–37.
358. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
359. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8.
360. Griffiths-Jones S. miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2010;Chapter 12:12.9.1-12.9.10.
361. Haussler J, Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet.* 2014;15(9):599-612.
362. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, Van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(14):6328–33.
363. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(23):17442–52.
364. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Mol Cell.* 2010;39(1):133–44.
365. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524–9.
366. Ghamlouche F, Yehya A, Zeid Y, Fakhereddine H, Fawaz J, Liu YN, et al. MicroRNAs as clinical tools for diagnosis, prognosis, and therapy in prostate cancer. *Transl Oncol.* 2023;28.

367. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrornas regulate cancer cell metastasis. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(15):10849–59.
368. 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;4.
369. Shi W, Yang J, Li S, Shan X, Liu X, Hua H, Zhao C, Feng Z, Cai Z, Zhang L, Zhou D. Potential involvement of miR-375 in the premalignant progression of oral squamous cell carcinoma mediated via transcription factor KLF5. *Oncotarget*. 2015;6(37):40172-85.
370. Salomon C, Das S, Erdbrügger U, Kalluri R, Kiang Lim S, Olefsky JM, et al. Extracellular Vesicles and Their Emerging Roles as Cellular Messengers in Endocrinology: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*. 2022;43(3):441–68.
371. Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet*. 2014;5:23.
372. Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013;119(6):1159–67.
373. Watanabe Y, Tomita M, Kanai A. Computational methods for microRNA target prediction. *Methods Enzymol*. 2007;427:65-86.
374. Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):1987.
375. Elton TS, Yalowich JC. Experimental procedures to identify and validate specific mRNA targets of miRNAs. *EXCLI J*. 2015;14:758-90.
376. 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.
377. Clapé C, Fritz V, Henriquet C, Apparailly F, Fernandez PL, Iborra F, et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS One*. 2009;4(10).
378. Ding G, Zhou L, Qian Y, Fu M, Chen J, Chen J, Xiang J, Wu Z, Jiang G, Cao L. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. *Oncotarget*. 2015;6(30):29877-88.
379. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):593–601.
380. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(23):15878–83.
381. Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, et al. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO Journal*. 2012;31(17):3513–23.
382. 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;25(4):501–15.

383. 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;109(31).
384. Ferrante SC, Nadler EP, Pillai DK, Hubal MJ, Wang Z, Wang JM, et al. Adipocyte-derived exosomal miRNAs: A novel mechanism for obesity-related disease. *Pediatr Res*. 2015;77(3):447–54.
385. 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;17(2):183–94.
386. 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;147(2):423–31.
387. O'Brien K, Lowry MC, Corcoran C, Martinez VG, Daly M, Rani S, Gallagher WM, Radomski MW, MacLeod RA, O'Driscoll L. miR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity. *Oncotarget*. 2015;6(32):32774-89.
388. 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;8(1).
389. Koeck ES, Iordanskaia T, Sevilla S, Ferrante SC, Hubal MJ, Freishtat RJ, et al. Adipocyte exosomes induce transforming growth factor beta pathway dysregulation in hepatocytes: A novel paradigm for obesity-related liver disease. *Journal of Surgical Research*. 2014;192(2):268–75.
390. Liu Y, Tan J, Ou S, Chen J, Chen L. Adipose-derived exosomes deliver miR-23a/b to regulate tumor growth in hepatocellular cancer by targeting the VHL/HIF axis. *J Physiol Biochem*. 2019;75(3):391–401.
391. Reza AMMT, Choi YJ, Yasuda H, Kim JH. Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti-proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells. *Sci Rep*. 2016;6:38498.
392. 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;7.
393. Weiner-Gorzel 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;4(5):745–58.
394. 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;335(1):201–4.
395. Ye SB, Li ZL, Luo DH, Huang BJ, Chen YS, Zhang XS, Cui J, Zeng YX, Li J. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(14):5439-52.
396. 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;12:3721–33.

397. 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. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2017;36(1).
398. 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;54(1):326–38.
399. 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;7.
400. 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. *Cellular Oncology*. 2020;43(1):123–36.
401. 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;78(18):5287–99.
402. 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;20(1).
403. Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*. 2014;124(25):3748-57.
404. 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;17(5):4463–73.
405. 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;49(2):838–46.
406. 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.
407. Hashimoto K, Ochi H, Sunamura S, Kosaka N, Mabuchi Y, Fukuda T, et al. Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(9):2204–9.
408. Probert C, Dottorini T, Speakman A, Hunt S, Nafee T, Fazeli A, et al. Communication of prostate cancer cells with bone cells via extracellular vesicle RNA; a potential mechanism of metastasis. *Oncogene*. 2019;38(10):1751–63.
409. Yu L, Sui B, Fan W, Lei L, Zhou L, Yang L, et al. Exosomes derived from osteogenic tumor activate osteoclast differentiation and concurrently inhibit osteogenesis by transferring COL1A1-targeting miRNA-92a-1-5p. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(3).
410. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(2):1397–405.
411. Josson S, Gururajan M, Sung SY, Hu P, Shao C, Zhou HE, et al. Stromal fibroblast-derived miR-409 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and prostate tumorigenesis. *Oncogene*. 2015;34(21):2690–9.

412. Takahara K, Ii M, Inamoto T, Nakagawa T, Ibuki N, Yoshikawa Y, et al. microRNA-145 mediates the inhibitory effect of adipose tissue-derived stromal cells on prostate cancer. *Stem Cells Dev.* 2016;25(17):1290–8.
413. 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;78(7):1833–44.
414. 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.
415. 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;515(2):345–51.
416. Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S, Matsumura Y. Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol.* 2011;2(4):215–22.
417. Sanz-Rubio D, Martin-Burriel I, Gil A, Cubero P, Forner M, Khalyfa A, et al. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects article. *Sci Rep.* 2018;8(1).
418. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20).
419. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1(1):15004.
420. Liu C, Eng C, Shen J, Lu Y, Takata Y, Mehdizadeh A, Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Li Y, Chang P, Mao Y, Hassan MM, Wang F, Li D. Serum exosomal miR-4772-3p is a predictor of tumor recurrence in stage II and III colon cancer. *Oncotarget.* 2016;7(46):76250-76260.
421. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1470–6.
422. Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, Malatesta S, Marchetti A, Rom WN, et al. MicroRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology.* 2013;8(9):1156–62.
423. Wang H, Hou L, Li A, Duan Y, Gao H, Song X. Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
424. Liu J, Sun H, Wang X, Yu Q, Li S, Yu X, et al. Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):758–73.
425. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(3):203-222.
426. Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Front Genet.* 2013;4:36.
427. Filella X, Foj L. miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(5):715-736.
428. 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;145:102860.

429. 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;106(4):768–74.
430. Thind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:31292.
431. 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;11(6).
432. Rodríguez M, Bajo-Santos C, Hessvik NP, Lorenz S, Fromm B, Berge V, Sandvig K, Linē A, Llorente A. Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Mol Cancer*. 2017;16(1):156.
433. 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;77(6):573–83.
434. 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;77(10):1167–75.
435. 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;259:135–9.
436. Endzelinš E, Berger A, Melne V, Bajo-Santos C, Sobolevska K, Abols 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).
437. Li W, Dong Y, Wang KJ, Deng Z, Zhang W, Shen HF. Plasma exosomal mir-125a-5p and mir-141-5p as non-invasive biomarkers for prostate cancer. *Neoplasma*. 2020;67(6):1314–8.
438. Zhou C, Chen Y, He X, Zheng Z, Xue D. Functional implication of exosomal miR-217 and mir-23b-3p in the progression of prostate cancer. *Onco Targets Ther*. 2020;13:11595–607.
439. 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;67(1):33–41.
440. Panigrahi GK, Ramteke A, Birks D, Abouzeid Ali HE, Venkataraman S, Agarwal C, Vibhakar R, Miller LD, Agarwal R, Abd Elmageed ZY, Deep G. Exosomal microRNA profiling to identify hypoxia-related biomarkers in prostate cancer. *Oncotarget*. 2018;9(17):13894–13910.
441. Matsuzaki K, Fujita K, Tomiyama E, Hatano K, Hayashi Y, Wang C, et al. MiR-30b-3p and miR-126-3p of urinary extracellular vesicles could be new biomarkers for prostate cancer. *Transl Androl Urol*. 2021;10(4).
442. 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;13(2):1–20.
443. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229–263.
444. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang YY, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, Garrido I, Escourrou G, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes exhibit

- an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* 2011;71(7):2455-65.
445. Corrêa LH, Heyn GS, Magalhaes KG. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells.* 2019;8(7):662.
446. Fletcher SJ, Sacca PA, Pistone-Creydt M, Coló FA, Serra MF, Santino FE, et al. Human breast adipose tissue: characterization of factors that change during tumor progression in human breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2017;36(1):1–13.
447. Cao H, Wang Y, Zhang D, Liu B, Zhou H, Wang S. Periprostatic Adipose Tissue: A New Perspective for Diagnosing and Treating Prostate Cancer. *J Cancer.* 2023;15(1):204–17.
448. Wu X, Daniels G, Lee P, Monaco ME. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2(2):111-20.
449. Fontaine A, Bellanger D, Guibon R, Bruyère F, Brisson L, Fromont G. Lipophagy and prostate cancer: association with disease aggressiveness and proximity to periprostatic adipose tissue. *Journal of Pathology.* 2021;255(2):166–76.
450. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011;155(2):117-30.
451. Cancel M, Crottes D, Bellanger D, Bruyère F, Mousset C, Pinault M, et al. Variable effects of periprostatic adipose tissue on prostate cancer cells: Role of adipose tissue lipid composition and cancer cells related factors. *Prostate.* 2024;84(4):358–67.
452. Meng H, Shen Y, Shen J, Zhou F, Shen S, Das UN. Effect of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cancer (PC-3) and prostate epithelial (RWPE-1) cells in vitro. *Lipids Health Dis.* 2013;12(1).
453. Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu J, Perry D, Cline JM, Thomas MJ, Thornburg T, Kulik G, Smith A, Edwards IJ, D'Agostino R, Zhang H, Wu H, Kang JX, Chen YQ. Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1866-75.
454. Zhou XL, Guo X, Song YP, Zhu CY, Zou W. The LPI/GPR55 axis enhances human breast cancer cell migration via HBXIP and p-MLC signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(3):459–71.
455. Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M. Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):339-50.
456. Console L, Scalise M, Mazza T, Pochini L, Galluccio M, Giangregorio N, Tonazzi A, Indiveri C. Carnitine Traffic in Cells. Link With Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:583850.
457. Farahzadi R, Hejazi MS, Molavi O, Pishgahzadeh E, Montazersaheb S, Jafari S. Clinical Significance of Carnitine in the Treatment of Cancer: From Traffic to the Regulation. *Oxid Med Cell Longev.* 2023;2023:9328344.
458. Westerhuis JA, van Velzen EJJ, Hoefsloot H CJ, Smilde AK. Discriminant Q2 (DQ2) for improved discrimination in PLS-DA models. *Metabolomics.* 2008;4(4):293–6.
459. Hada M, Edin ML, Hartge P, Lih FB, Wentzensen N, Zeldin DC, et al. Prediagnostic serum levels of fatty acid metabolites and risk of ovarian cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian (PLCO) cancer screening trial. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 2019;28(1):189–97.

460. Wadelius M, Autrup JL, Stubbins MJ, Andersson SO, Johansson JE, Wadelius C, Wolf CR, Autrup H, Rane A. Polymorphisms in NAT2, CYP2D6, CYP2C19 and GSTP1 and their association with prostate cancer. *Pharmacogenetics*. 1999;9(3):333-40.
461. He XF, Liu ZZ, Xie JJ, Wang W, Du YP, Chen Y, et al. Association between the CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis and meta-regression. *Tumor Biology*. 2014;35(10):9859–77.
462. Sobti RC, Onsory K, Al-Badran AI, Kaur P, Watanabe M, Krishan A, Mohan H. CYP17, SRD5A2, CYP1B1, and CYP2D6 gene polymorphisms with prostate cancer risk in North Indian population. *DNA Cell Biol*. 2006;25(5):287-94.
463. Luo Y, Liu JY. Pleiotropic Functions of Cytochrome P450 Monooxygenase-Derived Eicosanoids in Cancer. *Front Pharmacol*. 2020;11:580897.
464. Dahm CC, Gorst-Rasmussen A, Crowe FL, Roswall N, Tjøneland A, Drogan D, et al. Fatty acid patterns and risk of prostate cancer in a case-control study nested within the European prospective investigation into cancer and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;96(6):1354–61.
465. Scheinberg T, Mak B, Butler L, Selth L, Horvath LG. Targeting lipid metabolism in metastatic prostate cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2023;15:17588359231152839.
466. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2002;143(6):2376-84.
467. Zhang H, Liu S, Cai Z, Dong W, Ye J, Cai Z, et al. Down-regulation of ACACA suppresses the malignant progression of Prostate Cancer through inhibiting mitochondrial potential. *J Cancer*. 2021;12(1):232–43.
468. Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(15):6719-25.
469. Li X, Wu JB, Chung LW, Huang WC. Anti-cancer efficacy of SREBP inhibitor, alone or in combination with docetaxel, in prostate cancer harboring p53 mutations. *Oncotarget*. 2015;6(38):41018-32.
470. Altmann R, Hausmann M, Spöttl T, Gruber M, Bull AW, Menzel K, et al. 13-Oxo-ODE is an endogenous ligand for PPAR γ in human colonic epithelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(4):612–22.
471. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 2003;52(7):1655-63.
472. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014:149185.
473. Zhang Q, Sun L jiang, Yang Z gang, Zhang G ming, Huo R cha. Influence of adipocytokines in periprostatic adipose tissue on prostate cancer aggressiveness. *Cytokine*. 2016;85:148–56.
474. Zhang Q, Sun LJ, Qi J, Yang ZG, Huang T. Influence of adipocytokines and periprostatic adiposity measurement parameters on prostate cancer aggressiveness. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(4):1879–83.

475. Dorff TB, Goldman B, Pinski JK, Mack PC, Lara PN, Van Veldhuizen PJ, et al. Clinical and correlative results of SWOG S0354: A phase II trial of CNTO328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(11):3028–34.
476. Dahrán N, Szewczyk-Bieda M, Vinnicombe S, Fleming S, Nabi G. Periprostatic fat adipokine expression is correlated with prostate cancer aggressiveness in men undergoing radical prostatectomy for clinically localized disease. *BJU Int*. 2019;123(6):985–94.
477. Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):386-95.
478. Aldecoa Bedoya F. El factor de transcripción nuclear NF-κB en cáncer. *Horizonte Médico (Lima)*. 2023;23(1):e1987.
479. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: A review of current evidence. *Endocr Rev*. 2012;33(4):547–94.
480. Yang D, Li Y, Xing L, Tan Y, Sun J, Zeng B, et al. Utilization of adipocyte-derived lipids and enhanced intracellular trafficking of fatty acids contribute to breast cancer progression. *Cell Communication and Signaling*. 2018;16(1).
481. Louie SM, Roberts LS, Mulvihill MM, Luo K, Nomura DK. Cancer cells incorporate and remodel exogenous palmitate into structural and oncogenic signaling lipids. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831(10):1566–72.
482. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004;117(7):927-39.
483. Zeng Y, Gao M, Lin D, Du G, Cai Y. Prognostic and Immunological Roles of MMP-9 in Pan-Cancer. *Biomed Res Int*. 2022;2022.
484. Chen Y, Zhou Y, Han F, Zhao Y, Tu M, Wang Y, et al. A novel miR-1291-ERRα-CPT1C axis modulates tumor cell proliferation, metabolism and tumorigenesis. *Theranostics*. 2020;10(16):7193–210.
485. Watt MJ, Clark AK, Selth LA, Haynes VR, Lister N, Rebello R, Porter LH, Niranján B, Whitby ST, Lo J, Huang C, Schittenhelm RB, Anderson KE, Furic L, Wijayarathne PR, Matzaris M, Montgomery MK, Papargiris M, Norden S, Febbraio M, Risbridger GP, Frydenberg M, Nomura DK, Taylor RA. Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2019;11(478):eaau5758.
486. Welsh JA, Goberdhan DCI, O’Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024;13(2).
487. Massillo C, Duca RB, Lacunza E, Dalton GN, Farré PL, Taha N, et al. Adipose tissue from metabolic syndrome mice induces an aberrant miRNA signature highly relevant in prostate cancer development. *Mol Oncol*. 2020;14(11):2868–83.
488. Bonowicz K, Mikołajczyk K, Faisal I, Qamar M, Steinbrink K, Kleszczyński K, Grzanka A, Gagat M. Mechanism of Extracellular Vesicle Secretion Associated with TGF-β-Dependent Inflammatory Response in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):15335.

489. Cook DN, Kang HS, Jetten AM. Retinoic Acid-Related Orphan Receptors (RORs): Regulatory Functions in Immunity, Development, Circadian Rhythm, and Metabolism. *Nucl Receptor Res.* 2015;2.
490. Fan J, Lv Z, Yang G, Liao TT, Xu J, Wu F, et al. Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptors: Critical Roles in Tumorigenesis. *Front Immunol.* 2018;9:1187–1187.
491. Garattini E, Bolis M, Gianni' M, Paroni G, Fratelli M, Terao M. Lipid-sensors, enigmatic-orphan and orphan nuclear receptors as therapeutic targets in breast-cancer. *Oncotarget.* 2016;7(27):42661-42682.
492. Sakellakis M. Orphan receptors in prostate cancer. *Prostate.* 2022;82(10):1016–24.
493. Matsuoka H, Michihara A. Identification of the ROR α Transcriptional Network Contributes to the Search for Therapeutic Targets in Atherosclerosis. *Biol Pharm Bull.* 2021;44(11):1607-1616.
494. Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R, Smith DI. RORA, a large common fragile site gene, is involved in cellular stress response. *Oncogene.* 2006;25(20):2901–8.
495. Lee JM, Kim H, Baek SH. Unraveling the physiological roles of retinoic acid receptor-related orphan receptor α . *Exp Mol Med.* 2021;53(9):1278-1286.
496. Kallen JA, Schlaeppi JM, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, Fournier B. X-ray structure of the hROR α LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of ROR α . *Structure.* 2002;10(12):1697-707.
497. Du J, Xu R. ROR α , a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):15755–66.
498. Kim K, Boo K, Yu YS, Oh SK, Kim H, Jeon Y, et al. ROR α controls hepatic lipid homeostasis via negative regulation of PPAR γ transcriptional network. *Nat Commun.* 2017;8(1).
499. Takeda Y, Kang HS, Lih FB, Jiang H, Blaner WS, Jetten AM. Retinoid acid-related orphan receptor γ , ROR γ , participates in diurnal transcriptional regulation of lipid metabolic genes. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(16):10448–59.
500. Zhang W, Xiong Y, Tao R, Panayi AC, Mi B, Liu G. Emerging Insight Into the Role of Circadian Clock Gene BMAL1 in Cellular Senescence. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:915139.
501. Morales-Santana S, Morell S, Leon J, Carazo-Gallego A, Jimenez-Lopez JC, Morell M. An Overview of the Polymorphisms of Circadian Genes Associated With Endocrine Cancer. *Frontiers in endocrinology (Lausanne).* 2019;10:104–104.
502. Moretti RM, Marelli MM, Motta M, Polizzi D, Monestiroli S, Pratesi G, et al. Activation of the orphan nuclear receptor ROR α induces growth arrest in androgen-independent DU 145 prostate cancer cells. *Prostate.* 2001;46(4):327–35.
503. Moretti RM, Montagnani Marelli M, Sala A, Motta M, Limonta P. Activation of the orphan nuclear receptor ROR α counteracts the proliferative effect of fatty acids on prostate cancer cells: crucial role of 5-lipoxygenase. *Int J Cancer.* 2004;112(1):87–93.
504. Delerive P, Monté D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B. The orphan nuclear receptor ROR α is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep.* 2001;2(1):42-8.
505. Oh SK, Kim D, Kim K, Boo K, Yu YS, Kim IS, Jeon Y, Im SK, Lee SH, Lee JM, Ko Y, Lee H, Park D, Fang S, Baek SH. ROR α is crucial for attenuated inflammatory response to maintain intestinal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(42):21140-21149.

506. Wang Y, Solt LA, Kojetin DJ, Burris TP. Regulation of p53 stability and apoptosis by a ROR agonist. *PLoS One*. 2012;7(4).
507. Kim H, Lee JM, Lee G, Bhin J, Oh SK, Kim K, et al. DNA damage-induced ROR α is crucial for p53 stabilization and increased apoptosis. *Mol Cell*. 2011;44(5):797–810.
508. Li Y, He J, Yu L, Yang Q, Du J, Chen Y, et al. Hsa-miR-1290 is associated with stemness and invasiveness in prostate cancer cell lines by targeting RORA. *Andrologia*. 2022;54(5).
509. Nejati Moharrami N, Tande EB, Ryan L, Espevik T, Boyartchuk V. ROR α controls inflammatory state of human macrophages. *PLoS One*. 2018;13(11).
510. Park SC, Park IG, Kim H, Lee JM. N-terminal domain mediated regulation of ROR α 1 inhibits invasive growth in prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7).
511. Yang YM, Kim SY, Seki E. Inflammation and Liver Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Semin Liver Dis*. 2019;39(1):26–42.
512. Ito CY, Kazantsev AG, Baldwin AS Jr. Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(18):3787-92.
513. Marx J. Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science*. 2004;306(5698):966-8.
514. Jiang Y, Zhou J, Zhao J, Hou D, Zhang H, Li L, et al. MiR-18a-downregulated RORA inhibits the proliferation and tumorigenesis of glioma using the TNF- α -mediated NF- κ B signaling pathway. *EBioMedicine*. 2020;52.
515. Cheng D, Zhao S, Tang H, Zhang D, Sun H, Yu F, Jiang W, Yue B, Wang J, Zhang M, Yu Y, Liu X, Sun X, Zhou Z, Qin X, Zhang X, Yan D, Wen Y, Peng Z. MicroRNA-20a-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by downregulating Smad4. *Oncotarget*. 2016;7(29):45199-45213.
516. Bai X, Han G, Liu Y, Jiang H, He Q. MiRNA-20a-5p promotes the growth of triple-negative breast cancer cells through targeting RUNX3. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018;103:1482–9.
517. Li X, Pan JH, Song B, Xiong EQ, Chen ZW, Zhou ZS, et al. Suppression of CX43 expression by miR-20a in the progression of human prostate cancer. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(10):890–8.
518. Qiang XF, Zhang ZW, Liu Q, Sun N, Pan LL, Shen J, et al. MiR-20a promotes prostate cancer invasion and migration through targeting ABL2. *J Cell Biochem*. 2014;115(7):1269–76.
519. Ni S, Weng W, Xu M, Wang Q, Tan C, Sun H, et al. miR-106b-5p inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting CTSA. *Onco Targets Ther*. 2018;11:3835–45.
520. Luan W, Ding Y, Xi H, Ruan H, Lu F, Ma S, et al. Exosomal miR-106b-5p derived from melanoma cell promotes primary melanocytes epithelial-mesenchymal transition through targeting EphA4. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2021;40(1).
521. Yin W, Chen J, Wang G, Zhang D. MicroRNA-106b functions as an oncogene and regulates tumor viability and metastasis by targeting LARP4B in prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2019;20(2):951–8.

522. Dankert JT, Wiesehöfer M, Wach S, Czynnik ED, Wennemuth G. Loss of RBMS1 as a regulatory target of miR-106b influences cell growth, gap closing and colony forming in prostate carcinoma. *Sci Rep.* 2020;10(1).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN

VII. Publicaciones y comunicaciones durante la tesis doctoral

Artículos derivados de la Tesis

Título: The lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue reveals alterations in tumor cell's metabolic crosstalk

Autores: Altuna-Coy, A.; Ruiz-Plazas, X.; **Sánchez-Martín, S.**; Ascaso-Til, H.; Prados-Saavedra, M.; Alves-Santiago, M.; Bernal-Escoté, X.; Segarra-Tomás, J.; Chacón, M.R.

Revista científica: BMC Medicine

doi: <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02457-3>

Posición autoría: Co-autor

Estado: Publicado – 18/08/2022

Área: Medicine, General & Internal – 19/169 (Q1) – Impact Factor 2022: 9,3

Título: Tumoral periprostatic adipose tissue exovesicles-derived miR-20a-5p regulates prostate cancer cell proliferation and inflammation through the RORA gene

Autores: **Sánchez-Martín, S.**; Altuna-Coy, A.; Arreaza-Gil, V.; Bernal-Escoté, X.; García Fontgivell, G.F.; Ascaso-Til, H.; Segarra-Tomás, J.; Ruiz-Plazas, X.; Chacón, M.R.

Revista científica: Journal of Translational Medicine

doi: <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05458-3>

Posición autoría: Co-primer autor

Estado: Publicado – 15/07/2022

Área: Medicine, Research & Experimental – 29/189 (Q1) – Impact Factor 2023: 6,1

Comunicaciones en Congresos Nacionales e Internacionales durante la Tesis

Título: Periprostatic adipose tissue exomicroRNA profile in prostate cancer patients with different degree of aggressiveness.

Autores: **Silvia Sánchez-Martín**; 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: Póster (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; **Silvia Sánchez-Martín**; Marina Mendieta-Homs; Xavier Ruiz-Plazas; José Segarra-Tomás; Helena Ascaso-Til; Marta Alves-Santiago; Manuel Prados-Saavedra; Matilde R. Chacón.

Tipo de participación: Póster (PS03.11)

Fecha: 25/05/2022 – 29/05/2022

Congreso: ISEV Annual Meeting 2022 (Lyon, Francia)

Título: Lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue and its association with disease aggressiveness.

Autores: Victor Iranzo-Aguilar; Xavier Ruiz-Plazas; Antonio Altuna-Coy; **Silvia Sánchez-Martín**; Helena Ascaso-Til; Manuel Prados-Saavedra; Marta Alves-Santiago; Xana Bernal-Escoté; Matilde Rodríguez Chacón; José Segarra-Tomás.

Tipo de participación: Comunicación oral

Fecha: 02/03/2023 – 03/03/2023

Congreso: XIII Rising Stars in Urology (Granada, España)

Título: Los niveles de expresión del receptor Fn14 en semen de pacientes con Cáncer de Próstata son útiles como marcador de agresividad del tumor.

Autores: José Segarra-Tomás; Matilde Rodríguez-Chacón; Joan Francesc García-Fontgivell; Xana Bernal-Escoté; Beatriz de Regas-Peña; Alex Boix-Bonfill; Victor Iranzo-Aguilar; **Silvia Sánchez-Martín**; Antonio Altuna-Coy; Xavier Ruiz-Plazas; Pol Ballester-Campañá.

Tipo de participación: Comunicación oral

Fecha: 24/05/2023 – 26/05/2023

Congreso: LXXXVI Congreso Nacional de Urología (Palma de Mallorca, España)

Título: El tejido adiposo periprostático tumoral de pacientes con cáncer de Próstata agresivo está “delipidado” favoreciendo la agresividad del tumor.

Autores: José Segarra-Tomás; Matilde Rodríguez-Chacón; Joan Francesc García-Fontgivell; Xana Bernal-Escoté; Beatriz de Regas-Peña; Alex Boix-Bonfill; Victor Iranzo-Aguilar; **Silvia Sánchez-Martín**; Antonio Altuna-Coy; Pol Ballester-Campañá; Xavier Ruiz-Plazas; Beatriz de Regas-Peña.

Tipo de participación: Comunicación oral

Fecha: 24/05/2023 – 26/05/2023

Congreso: LXXXVI Congreso Nacional de Urología (Palma de Mallorca, España)

Título: Differential Effects of Human Periprostatic Adipose Tissue-Derived Vesicles on Prostate Cancer Microenvironment Based on Tumour Aggressiveness.

Autores: Verónica Arreaza-Gil, Gabriela-Altamirano, Antonio Altuna-Coy, **Silvia Sánchez-Martín**, Natalia Diaz-Valdivia, Jordi Alcaraz, Xana Bernal-Escoté, Joan Francesc Garcia-Fontgivell, Helena Ascaso-Til, José Segarra-Tomás, Xavier Ruiz-Plazas, Matilde R. Chacón.

Tipo de participación: Comunicación oral

Fecha: 19/11/2024 - 22/11/2024

Congreso: Reunión Anual de Sociedades de Biociencias – SAIC, SAFIC y ALACF (Buenos Aires, Argentina).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

El papel del tejido adiposo periprostático en el metabolismo lipídico del tumor y el impacto de sus vesículas secretadas en la progresión del cáncer de próstata

SILVIA SÁNCHEZ MARTÍN



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI