

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Factores angiocrinos liberados por las células endoteliales
inducen la expresión de factores pro-angiogénicos en cáncer
prostático**

CAROLINA ANDREA GAETE PIUTRÍN

Memoria de título para optar al título profesional de bioquímico

Director de Memoria

Dr. Alejandro Samuel Godoy Sánchez

Centro de biología Celular y Biomedicina
Facultad de Medicina y Ciencia
Universidad San Sebastián

Profesor Patrocinante

Dr. Dante Mauricio Miranda Wilson

Laboratorio de Inmunobioquímica y Cáncer.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile, 2020

Financiamiento

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de endocrinología y metabolismo tumoral del Departamento de Fisiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile y fue financiada por el proyecto FONDECYT Regular 1161115.

Índice de contenidos

Financiamiento	ii
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	viii
Introducción	1
• Epidemiología del Cáncer de Próstata	1
• Aspectos biológicos y clínicos del Cáncer de Próstata	1
• Microambiente tumoral y su influencia en el Cáncer de Próstata	2
• Angiogénesis y su importancia en el desarrollo del Cáncer de Próstata.	3
• “Switch” angiogénico: evento clave en la progresión del cáncer.	4
• Rol angiocrino de las células endoteliales en el Cáncer de Próstata.	5
Hipótesis	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
• 1. Estudiar el efecto angiocrino de células HUVEC sobre la expresión de factores reguladores del proceso angiogénico en la línea celular PC3.	10
• 2. Estudiar el efecto angiocrino de células HUVEC sobre la expresión de factores reguladores del proceso angiogénico en el modelo de xenoinjerto de la línea celular de cáncer prostático humana PC3 en ratones inmunosuprimidos del tipo NSG.	11
• 3. Estudiar el efecto paracrino de la línea celular de cáncer prostático humano PC3 sobre la capacidad angiogénica de células HUVEC.	11
Metodología	11
• Materiales y métodos	11
<i>Cultivo celular</i>	11
<i>Preparación de los Medios Condicionados de HUVEC y PC3 educadas.</i>	12
<i>Cultivo celular de PC3 educadas para extracción de ARN total.</i>	12
<i>Ensayo de viabilidad</i>	12
<i>Ensayo de formación de tubos</i>	13
<i>Inmunohistoquímica</i>	13
<i>Extracción de RNA total</i>	14
<i>Síntesis de ADNc</i>	14
<i>Análisis de la expresión de factores angiogénico mediante “RNA-seq”</i>	15
<i>Diseño de partidores</i>	15

<i>Análisis de la expresión de factores angiogénicos mediante RT-qPCR</i>	16
<i>Análisis estadístico</i>	16
Resultados	17
• OBJETIVO 1: Estudiar el efecto angiocrino de células HUVEC sobre la expresión de factores reguladores del proceso angiogénico en la línea celular PC3.....	17
Obtención y selección de los MC de células HUVEC para el tratamiento de la línea celular PC3 mediante ensayo de viabilidad MTT	17
Análisis <i>in silico</i> del “RNA-seq” de la línea celular PC3 educadas mediante la plataforma computacional “Gene Set Enrichment analysis” (GSEA).	18
Comprobar mediante RT-qPCR la expresión de los factores angiogénicos de la línea celular PC3 educadas.....	19
• OBJETIVO 2: Estudiar el efecto angiocrino de células HUVEC sobre la expresión de factores reguladores del proceso angiogénico en el modelo de xenoinjerto de la línea celular de cáncer prostático humana PC3 en ratones inmunosuprimidos del tipo NSG.	22
• OBJETIVO 3: Estudiar el efecto paracrino de la línea celular de cáncer prostático humano PC3 sobre la capacidad angiogénica de células HUVEC..	23
Discusión.....	25
Conclusión	28
Bibliografía	29

Abreviaturas

CaP: Cáncer de próstata

MAT: Microambiente tumoral

DMV: Densidad microvascular

CEs: Células endoteliales

PC3: Línea epitelial humana de adenocarcinoma prostático metastásico resistente a castración

HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 α

IL: Interleuquina

ANGPTL-4: Angiopoyetina tipo 4

OMS: Organización Mundial de la Salud

PSA: Antígeno prostático específico

ADT: Terapia de privación de andrógenos

MEC: Matriz extracelular

MC: Medio condicionado

PC3 educadas: PC3 estimuladas con MC de células HUVEC

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1

HPRT1: Hipoxantinaguanina fosforibosiltransferasa.

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es el tipo tumoral más diagnosticado en los hombres en los países desarrollados y el segundo a nivel mundial. En Chile, CaP correspondió a la segunda causa de muerte en hombres durante el año 2018. En la actualidad, se concibe al CaP como una enfermedad que depende de la interacción compleja que existe entre las células epiteliales malignas y las células benignas que forman el compartimento estromal, conocido como microambiente tumoral (MAT). Dentro del MAT, las células endoteliales (CEs) cumplen un rol esencial en la neovascularización del tumor o angiogénesis. Además, la progresión del CaP y la agresividad está relacionada con el desarrollo de la angiogénesis. Este proceso permite tanto la perfusión de los nutrientes y oxígeno hacia el tumor, así como también eliminar los desechos metabólicos celulares, permitiendo así la progresión del cáncer en términos de proliferación tumoral y su diseminación a otros órganos. Debido a la falta de terapias anti-angiogénicas efectivas en CaP, que contrarrestan predominantemente a las CEs altamente proliferativas, se postula que las CEs en reposo (no proliferativas), que no son afectadas por este tipo de terapias, podrían estar cumpliendo un rol protector y potenciador para la progresión del tumor, a través de un mecanismo paracrino (o mecanismo angiocrino). Si bien, en la literatura se ha demostrado que las CEs, a través de mecanismos angiocrinos, pueden promover la proliferación de células tumorales, incluyendo células de CaP; aun persisten múltiples interrogantes sobre el rol, los efectos y la capacidad de los mecanismos angiocrinos. En el siguiente trabajo se propuso responder si las CEs son capaces de promover, tanto *in vitro* como *in vivo*, la expresión de señales pro-angiogénicas en las células de CaP mediante un mecanismo angiocrino; y si este efecto en las células CaP produce un aumento en su capacidad de promover angiogénesis. Para llevar a cabo esta investigación, se utilizó una línea de células cancerígenas de CaP resistente a la castración, conocida como PC3, y el cultivo primario de CEs extraídas de la vena del cordón umbilical humana, conocida como HUVEC. En primer lugar, se analizó la expresión de factores angiogénicos en el modelo *in vitro* de las células PC3 tratadas previamente con medio condicionado (MC) de las células HUVEC, las cuales denominamos PC3 educadas. En segundo lugar, se analizó la expresión de HIF-1 α (Factor inducible por hipoxia 1 α) en el modelo *in vivo* de xenoinjerto de PC3 educadas en ratones NSG. La condición control para PC3 educada es PC3 sin tratamiento con MC (PC3 sin educar). Y en tercer lugar, se analizó el efecto biológico del MC de células PC3 educadas en la capacidad de estimular a las células HUVEC en la formación de tubos. La condición control de MC de células PC3 educadas es el MC de

células PC3 sin educar. Los resultados *in vitro* mostraron que el MC de células HUVEC aumentó la expresión de transcritos para los factores angiogénicos VEGF-A (Factor de crecimiento vascular endotelial A), HIF-1 α , IL-1 β (Interleuquina 1 β) y ANGPTL-4 (Angiopoyetina tipo 4) en células PC3, respecto a la condición control. Sin embargo, los resultados obtenidos del ensayo *in vivo* no mostraron un aumento significativo de la expresión proteica de HIF-1 α en los tumores formados por células PC3 educadas, respecto al control. Por último, nuestros resultados mostraron que las células HUVEC estimuladas con MC de células PC3 educadas aumentaron su capacidad de formación de tubos, en comparación con la condición control, demostrando la generación de una respuesta paracrina desde las células epiteliales hacia las endoteliales. La relevancia de los resultados de este trabajo es que adicionalmente al efecto angiocrino observado, esta investigación aporta un antecedente más, al hecho de que existe una comunicación constante y bidireccional entre las células tumorales y las células endoteliales.

Abstract

Prostate cancer (PCa) represents the most diagnosed type of cancer in men in developed countries and second most common worldwide. In Chile, PCa was the second leading cause of cancer-related deaths in 2018. Nowadays, PCa is conceived as a disease that depends on a complex interaction between malignant epithelial cells and benign cells that form the stromal compartment, known as the tumor microenvironment (TME). Inside TME, endothelial cells (EC) have a major role in tumor neovascularization or angiogenesis. Moreover, PCa progression and aggressiveness is related to angiogenesis development. This biological process enhances oxygen and nutrients distribution to the tumor and eliminates metabolic wastes, thus leading to tumor progression reflecting as proliferation and second tumor niches. Due to the lack of effective anti-angiogenic therapies in PCa, for highly proliferative EC, it is postulated that resting EC (non-proliferative), which are not affected by this type of therapy, may be playing a protective role and enhancing tumor progression, through a paracrine (or angiocrine) mechanism. Current literature has described that EC acts through angiocrine mechanisms, stimulating cellular proliferation including PCa; it remains unclear the multiple roles, effects and capacity of the angiocrine mechanisms. In the present study, we proposed to answer whether EC are able to promote the expression of pro-angiogenic signals in PCa cells through an angiocrine mechanism and whether this effects in PCa cells produces an increase in their capacity to promote angiogenesis. To carry out this research, we used a castration-resistant PCa cell line, known as PC-3, and the primary cultured of EC extracted from human umbilical cord vein, known as HUVEC. In first place, we analyzed the expression angiogenic factors using an *in vitro* model of PC3 cell previously treated with conditioned medium (CM) from HUVEC cells, which we call educated PC-3. Secondly, the expression of HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α) was analyzed using an *in vivo* model of PC3 xenograft educated in NSG mice. The control condition for educated PC3 is PC3 without CM treatment (uneducated PC3). And thirdly, we analyzed the biological effect of CM of educated PC-3 cells on the ability to stimulate HUVEC cells in formation. The control condition of CM of educated PC3 cells is CM of uneducated PC3 cells. Our *in vitro* results showed that CM of HUVEC cells enhanced the expression of transcripts for the angiogenic factors VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A), HIF-1 α , IL-1 β (Interleukin 1 β) and ANGPTL-4 (Angiopoietin-like 4) in PC3 cell lines. However, the results obtained from *in vivo* experiments it did not show a significant increase in the protein expression of HIF-1 α in the tumors formed by educated PC3 cells, with respect to the control. Lastly, our results showed that CM stimulated HUVEC cells from

educated PC3 cells increased their tube formation capacity, compared to the control condition, demonstrating the generation of paracrine response from epithelial cells to endothelial cells. The importance of these results of this work is that in addition to the angiocrine effect observed, this research provides a further background to the fact that there is a constant and bidirectional communication between tumor cells and endothelial cells.

Introducción

Epidemiología del Cáncer de Próstata

El Carcinoma de Próstata (CaP) es el segundo cáncer no cutáneo más común en los hombres adultos a nivel mundial. En países desarrollados como EE.UU, el CaP representa la segunda causa de muerte por cáncer (Siegel et al., 2019). Según la organización mundial de la salud (OMS) el CaP es el cáncer más diagnosticado entre los hombres en más de la mitad de los países del mundo, incluyendo todo América, y fue la quinta causa de muerte por cáncer en el año 2018 (Siegel et al., 2018), estimándose que 41 hombres mueren de CaP cada hora en el mundo. La situación en Chile es similar, ya que, de acuerdo a la OMS, el CaP representó la segunda causa de muerte por cáncer en el año 2018, después del cáncer gástrico, estimándose que 6 hombres mueren de CaP al día en nuestro país. Esta cifra no ha cambiado desde el año 2015 en Chile, según información entregada por el MINSAL (Minsal, 2018). Estudios epidemiológicos establecen que el factor de riesgo más significativo para el CaP es la edad avanzada (Rawla, 2019). Sin embargo, no es simplemente un subproducto del envejecimiento sino también una consecuencia de múltiples factores como la herencia genética (Goldgar et al., 1994; Lichtenstein et al., 2000), la raza o etnia, el nivel socioeconómico y factores ambientales que rodean al paciente (Siegel et al., 2018, 2019; G. Wang et al., 2018).

Aspectos biológicos y clínicos del Cáncer de Próstata

La próstata es la principal glándula masculina ubicada en la cavidad pélvica, específicamente debajo de la vejiga rodeando el conducto eyaculador, y tiene como función la producción del líquido seminal que forma parte del semen (Verze et al., 2016). Esta glándula es objeto directo de una serie de enfermedades tanto benignas (prostatitis e hiperplasia prostática benigna) como malignas (CaP) (Verze et al., 2016). El tejido normal epitelial de la glándula prostática, que da origen al CaP, es un epitelio pseudoestratificado compuesto por células luminales secretoras, células basales y células neuroendocrinas confinadas por una membrana basal, la cual separa el tejido epitelial del compartimento estromal (Corn, 2012; G. Wang et al., 2018). La carcinogénesis de próstata comienza en el compartimento epitelial, con una neoplasia intraepitelial de las células prostáticas, la cual progresa a unCaP localizado, es decir, las células tumorales se mantiene dentro de la glándula (Shen & Abate-Shen, 2010). Debido a que el cáncer de próstata se caracteriza, en general, por ser un tumor de

lento crecimiento (Rawla, 2019); los tratamiento en etapas iniciales de la enfermedad (asintomático y local) donde a menudo tiene un curso indolente, incluyen, vigilancia activa con o sin tratamiento paliativos, cirugía (prostatectomía radical) y/o radioterapia con o sin terapia de privación de andrógenos (ADT) (Arora & Barbieri, 2018; Litwin & Tan, 2017). Luego en etapas más avanzadas, (etapas clínicamente significativas) las células tumorales adquieren la capacidad de invadir el tejido circundante de la glándula y puede migrar a órganos más distantes, proceso denominado metástasis, siendo la principal causa de muerte relacionadas con CaP (Arora & Barbieri, 2018; Shen & Abate-Shen, 2010). El CaP metastásico es sensible a andrógeno debido a su dependencia en la señalización del receptor de andrógeno y, por lo tanto, el tratamiento estándar de atención es la ADT (Arora & Barbieri, 2018). A pesar de que en primera instancia se observa una regresión del tumor con la ADT, estos pacientes tratados desarrollan resistencia al ADT en un periodo de 2 a 5 años, lo que resulta en un CaP resistente a la castración o en un CaP resistente a la castración metastásico, donde este último tiene una sobrevida de 14 meses aproximadamente (Ritch & Cookson, 2016). Para estos casos, el tratamiento utilizado es ADT de segunda generación o quimioterapia, las cuales aumentan el tiempo de sobrevida en meses, sin embargo, en esta etapa la enfermedades letal (Ritch & Cookson, 2016). Por lo tanto, la baja probabilidad de éxito de los tratamientos para los pacientes con CaP resistente a castración convierte a esta enfermedad en un área de investigación altamente necesaria para comprender mejor la biología de esta enfermedad y el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos.

Microambiente tumoral y su influencia en el Cáncer de Próstata

El año 2012, Hanahan y Coussens incorporaron en la biología del cáncer la importancia de la influencia celular del microambiente tumoral (MAT). El MAT corresponde a todos los componentes celulares y no celulares que componen un tumor, excluyendo las células cancerígenas (Hanahan & Coussens, 2012). Es decir, el MAT se compone del compartimento estromal que consta de múltiples células no malignas como los fibroblastos, miofibroblasto, células endoteliales, pericitos, células de musculo liso, células infiltradas del sistema inmune, y la matriz extracelular (MEC) (Corn, 2012; Joyce, 2005; Levesque & Nelson, 2018). La comunicación entre el compartimento epitelial y estromal se produce por el contacto directo entre células y/o por factores solubles como citoquinas y otras moléculas extracelulares que componen la MEC (Corn, 2012; Levesque & Nelson, 2018). Frecuentemente, el proceso de carcinogénesis se ve acompañado por cambios fenotípicos histológicos en el estroma,

denominado estroma reactivo. Esta activación corresponde principalmente a un aumento en la población de fibroblastos y miofibroblastos (que son las células responsables de sintetizar, depositar y remodelar la MEC), modificación de la MEC, una disminución significativa de células diferenciadas del musculo liso y un aumento en la densidad microvascular (DMV) (Corn, 2012; Krušlin et al., 2015). En el CaP está activación del estroma se debe a que las células tumorales, a través de un mecanismo paracrino (secreción de moléculas solubles) modulan el comportamiento estromal, creando así un ambiente favorable para la progresión del tumor (Tuxhorn et al., 2001). Entre las células del MAT que podrían estar afectando el comportamiento y la malignidad del CaP se encuentran los fibroblastos asociados al cáncer, las células del estroma mesenquimatosas derivadas de la médula ósea, las células precursoras endoteliales, los macrófagos asociados al cáncer, y las células endoteliales (CEs) (Chiarugi et al., 2014). Al igual que CaP y otros cánceres, la progresión tumoral abarca la proliferación de células cancerígenas y los procesos de angiogénesis, invasión, formación de metástasis, evasión inmunológica y la resistencia terapéutica (Hanahan & Coussens, 2012; Hanahan & Weinberg, 2011). Es importante mencionar, que al igual que los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como también la capacidad de poder eliminar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono para su viabilidad y progresión. Por lo tanto, la neovasculatura asociada al tumor, generada por el proceso de angiogénesis, aborda estas necesidades (Butler et al., 2010).

Angiogénesis y su importancia en el desarrollo del Cáncer de Próstata.

Existe una extensa literatura que sostiene la importancia del proceso de angiogénesis en la contribución del crecimiento y progresión de los tumores (Hanahan & Weinberg, 2000). En 1971, Folkman por primera vez formuló la hipótesis de que el crecimiento tumoral y la metástasis eran procesos dependientes de angiogénesis tumoral, y por lo tanto, al ser bloqueados a través de una terapia que contrarrestara el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos hacia el tumor (terapia anti-angiogénica), se podría detener la progresión del cáncer (Folkman, 1971, 2007). La angiogénesis es el proceso donde las células endoteliales se activan, proliferan y migran desde un vaso pre-existente a favor de una gradiente de factores de crecimiento y quimioquinas, por ejemplo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), formando así nuevos vasos sanguíneos (Sturtzel, 2017; Tello-Montoliu A et al., 2006). Los vasos sanguíneos existen como capilares, venas o arterias, cubiertos por células de soporte, y sus principales funciones son el transporte de oxígeno, así como de nutrientes y células inmunes a los

diversos tejidos del cuerpo (Sturtzel, 2017). La vasculatura en general está compuesta por CEs, pericitos, células de músculo liso y una membrana basal como componente estructural y funcional de los vasos. La membrana basal delimita las CEs, que constituyen la superficie interna de los vasos, con los pericitos que son células especializadas de músculo liso que residen fuera del vaso y otorga estabilidad mecánica y supervivencia a las CEs (Mueller & Fusenig, 2004). En los tejidos normales, la angiogénesis se produce durante el crecimiento y en el desarrollo embriogénico, así como también, en procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo femenino, de forma transitoria (Bergers & Benjamin, 2003; Hanahan & Folkman, 1996). Luego de la señalización angiogénica, la vasculatura normal se vuelve inactiva o quiescente. Por el contrario, en el cáncer la angiogénesis permanece activa producto de una desregulación de mecanismos promotores o supresores, cuyo desequilibrio provocan un cambio o “switch” angiogénico hacia estados pro-angiogénicos, volviendo a un tumor más agresivo en términos crecimiento, supervivencia, invasión y metástasis (Bergers & Benjamin, 2003; Hanahan & Folkman, 1996).

“Switch” angiogénico: evento clave en la progresión del cáncer.

Las células tumorales pueden iniciar o propagar el “switch” angiogénico por la secreción de factores pro-angiogénicos (Bergers & Benjamin, 2003). Un estudio realizado por Weidner y colaboradores observaron que la DMV de CaP ha demostrado ser un indicador de pronóstico significativo y tiene una relación directa con el grado de agresividad de la enfermedad (Weidner et al., 1993). Actualmente, es ampliamente sabido que el rápido aumento de la masa tumoral produce zonas hipóxicas (bajos niveles de oxígeno), lo que conlleva a una activación de la señalización del factor inductor de la hipoxia (HIF-1) en las células tumorales (Mittal et al., 2014). HIF-1 aumenta la transcripción de varios genes pro-angiogénicos, entre ellos VEGF, inclinándolo el equilibrio hacia un “switch” angiogénico, provocando el crecimiento y formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor (Mittal et al., 2014). Los tumores desarrollan una vasculatura morfológicamente aberrante con un fenotipo inmaduro, sin cobertura de pericitos, excesiva permeabilidad, un flujo sanguíneo discontinuo y ramificación aberrantes (Bergers & Benjamin, 2003; Russo et al., 2012). La desorganización de la arquitectura vascular resulta en un suministro de sangre limitado y un transporte de oxígeno ineficiente, y como consecuencia, se induce un estado hipóxico en las células tumorales manteniéndose así, el proceso de angiogénesis activo (Russo et al., 2012). Hace diez años atrás, se creía que el rol de la vasculatura

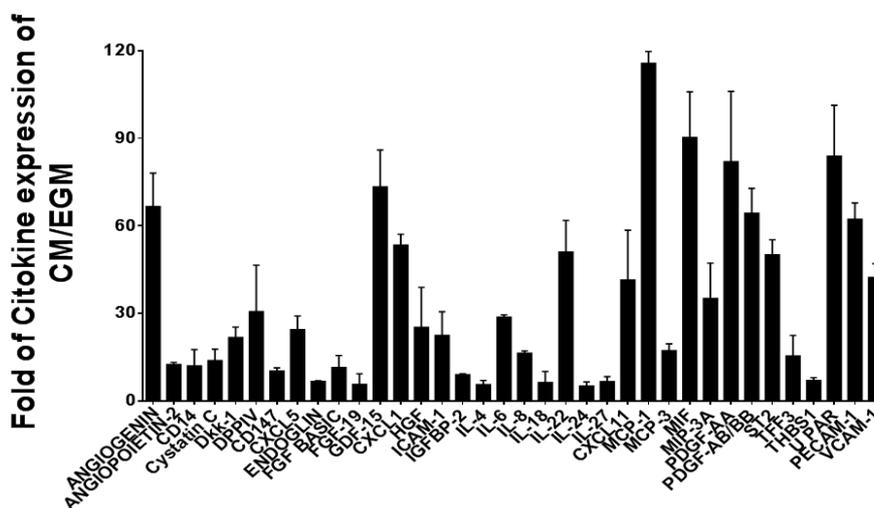
tumoral se limitaba meramente a ser conductos pasivos y permisivos para el suministro de oxígeno y nutrientes hacia el tumor (Butler et al., 2010), pero debido al fracaso de las terapias anti-angiogénicas en interrumpir la progresión del cáncer y aumentar la supervivencia del paciente (Abdollahi & Folkman, 2010), se sugirió que la interacción entre las células tumorales y las CEs es más compleja y podrían existir mecanismos de comunicación celular que median señalización de proliferación y supervivencia (Butler et al., 2010).

Rol angiocrino de las células endoteliales en el Cáncer de Próstata.

En la actualidad, las terapias anti-angiogénicas en el CaP no han logrado una respuesta tumoral y un aumento en la supervivencia de los pacientes (Bilusic & Wong, 2014). Una de las hipótesis que explicaría el fracaso de estas terapias, es que las CEs del MAT mediante un mecanismo paracrino (o mecanismo angiocrino), participarían directamente en la iniciación o la progresión de varios tipos de tumores sólidos de manera independiente a la perfusión (Butler et al., 2010; Franses & Edelman, 2011). Al igual que en la organogénesis y en la reparación de heridas, las CEs mediante la liberación de una amplia gama de factores de crecimiento y otras moléculas afectarían de forma angiocrina a las células tumorales, contribuyendo así a su progresión (Pasquier et al., 2020). Varios estudios han demostrado que la presencia de una comunicación cruzada entre las CEs que componen la vasculatura tumoral y las células de cáncer favorece el proceso de angiogénesis, mediado por los factores pro-angiogénicos (Pasquier et al., 2020). Asimismo, un estudio *in vivo* demostró que las células leucémicas secretan factores angiogénicos, entre ellos VEGF-A, que activa las CEs para liberar factores angiocrinos que a su vez promueven la proliferación de las células leucémicas a través de un mecanismo paracrino (Dias et al., 2001).

La utilización de las células endoteliales de vena de cordón umbilical humana (HUVEC) como modelo de investigación en cáncer ha proporcionado extensa información con respecto al rol angiocrino de las CEs en la progresión tumoral, incluyendo invasión, formación de metástasis y crecimiento tumoral (X. Wang et al., 2013; Y. Wang et al., 2013). Un estudio realizado *in vivo* en un modelo de cáncer de hígado, observó que las células HUVEC mediante un mecanismo angiocrino promueven la progresión del cáncer en términos de proliferación, migración e invasión (Y. Wang et al., 2013). Resultados similares se observan en estudios realizados con CEs en diversos tipos de tumores, como por ejemplo, en cerebro, pulmón, riñón, mama, ovario y sangre (Pasquier et al., 2020). Para dilucidar, los factores asociados a

los mecanismos angiocrinos, en nuestro laboratorio se realizó un análisis del perfil de citoquinas secretadas (secretoma) por las células HUVEC (Figura 1) y se determinó que estas células son capaces de sobre-expresar ciertos factores de crecimiento capaces de estimular la proliferación de células de tumorales (Torres-estay et al., Manuscrito en revisión).



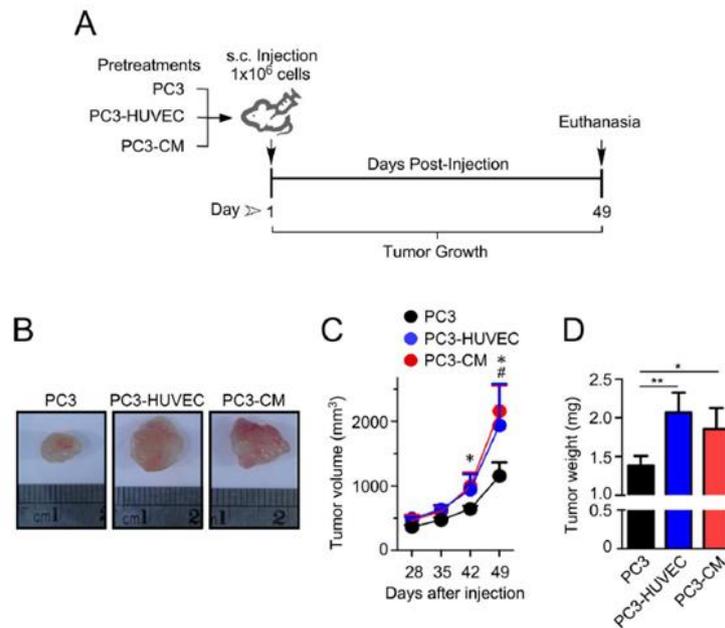


Figura 2: El medio condicionado de las células HUVEC aumenta el crecimiento del tumor del PCa *in vivo*. A) Representación grafica de las condiciones experimentales de las inyecciones subcutáneas de las células PC3 en ratones NSG. Las condiciones experimentales fueron: 1×10^6 células PC3 solas (control), PC3 co-inyectadas con las células HUVEC (5:1), y PC3 pre-tratadas durante 48 horas con MC (o "CM") de células HUVEC antes de inyectarlas al ratón junto a una mezcla de Matrigel (1:1) para un volumen total de inyección de 100 μ L. B) Imagen representativa de los tumores subcutáneos extraídos quirúrgicamente para las tres condiciones. C) Gráficos del volumen promedio tumoral de las distintas condiciones medido a partir del día 28 post xenoinjerto. El volumen del tumor se determinó midiendo los diámetros, mayor (L) y menor (W), con un calibrador electrónico y se calculó con la fórmula: volumen del tumor = $L \cdot W \cdot W / 2$. (n=11; *p \leq 0,05 versus PC3-CM, #p \leq 0,05 versus PC3-HUVEC. Anova test). D) El peso promedio del tumor (mg) fue medido después de la resección quirúrgica de los tumores. (n=11; *p \leq 0.05, prueba t).

Adicionalmente, se analizó mediante inmunohistoquímica la cantidad de células endoteliales, mediante el marcador CD31, y la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en los tumores (Figura 3). Los resultados mostraron que la expresión de ambas proteínas se encuentran aumentada en los tumores de células PC3 pre-tratadas con MC de células HUVEC en comparación con los tumores PC3 no tratados, sugiriendo un incremento de la capacidad angiogénica.

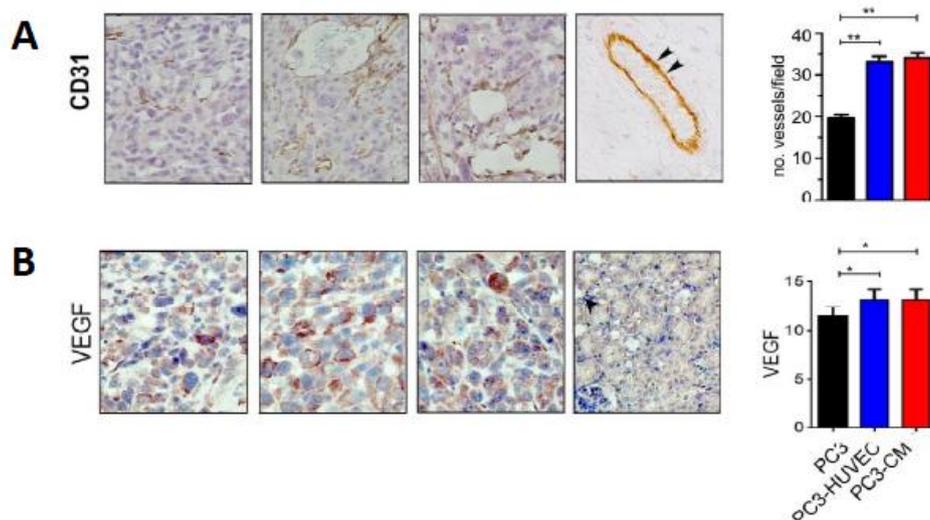


Figura 3: El MC de las células HUVEC aumenta la proliferación de CaP y la densidad microvascular *in vivo*. A) Imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico del marcador CD31 (a la izquierda) y su posterior cuantificación del número de vasos por campo (a la derecha). B) Imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico para VEGF-A (a la izquierda) y su posterior cuantificación del número de células positivas por área inmunoteñida (a la derecha). Los controles positivos para la expresiones de CD31 y VEGF-A fueron los tejidos de adiposo de ratón y de hígado humano, respectivamente (n=8; *p ≤ 0.05 y **p ≤ 0.01, t-test).

En nuestro laboratorio, además de los ensayos mencionados, se realizó un análisis del secretoma de las células PC3 expuesta al MC de células HUVEC, con la finalidad de dilucidar las moléculas que son secretadas por efecto del MC. Estos resultados mostraron que las células PC3 tratadas con MC secretan diversos factores de crecimiento, como por ejemplo, VEGF, PDGF-A y angiopoyetina-2 (Figura 4), documentados extensamente como factores pro-angiogénicos (Mittal et al., 2014).

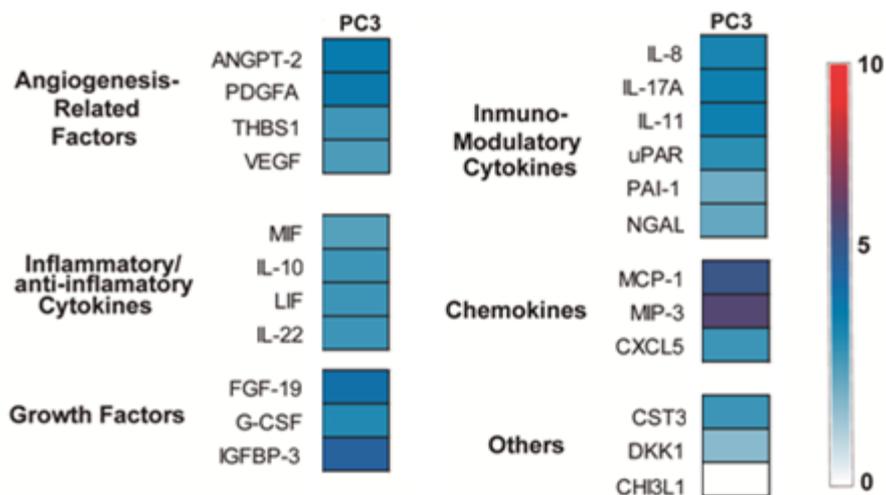


Figura 4: Factores secretados involucrados en la comunicación cruzada entre las células endoteliales y CaP. Representación del incremento de las proteínas secretadas por las células PC3 tratadas con MC de células HUVEC por 48 horas versus el control (medio normal de crecimiento libre de suero) analizadas mediante el “Proteome profiler human XL cytokine array®” (R&D Systems). Las proteínas se dividen según su función biológica. Los cuadrados blancos indican que los factores no están aumentados, los cuadros azules indican una inducción media de expresión y los cuadros rojos indican una inducción máxima (50x). Las citoquinas y los factores de crecimiento que tenían 1,5 veces o más en relación con el control fueron calificados como positivos. N biológico 2.

Teniendo en consideración los elementos expuestos y los experimentos realizados en nuestro laboratorio, este trabajo se enfocó en profundizar y obtener información concreta sobre los cambios moleculares producido en el modelo celular de CaP, PC3, por señales angiocrinas de células HUVEC y, a su vez, los efectos biológicos producidos en células HUVEC por las señales paracrinadas mediadas por los cambios moleculares anteriormente mencionado en las células PC3 educadas (Figura 5).

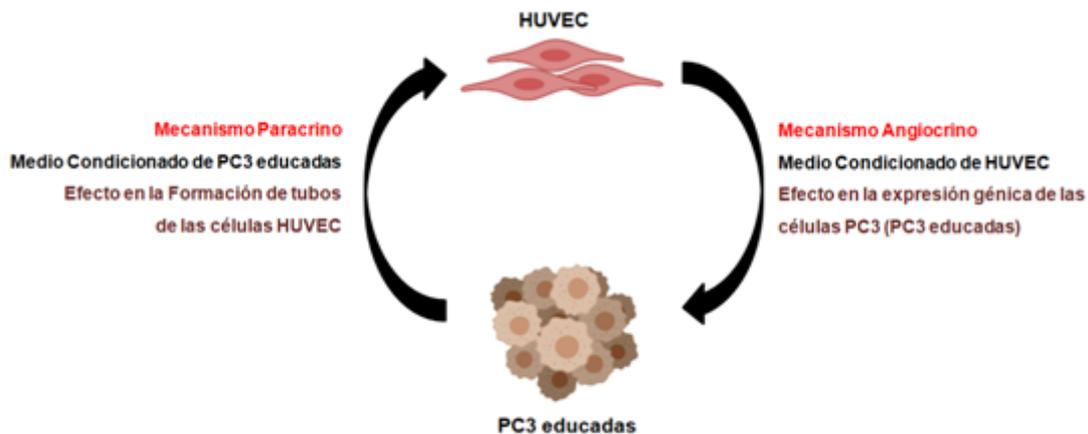


Figura 5: Comunicación paracrina entre las células endoteliales HUVEC y la línea de cáncer prostático PC3. Representación grafica de la comunicación cruzada en donde las células HUVEC a través de moléculas solubles presentes en el MC de HUVEC (mecanismo angiocrino) afectarían la expresión génica en las células PC3, denominadas PC3 educadas. Luego estas células PC3 educadas mediante las moléculas solubles presentes en el MC de PC3 educadas (mecanismo paracrino) afectarían la formación de tubos en las células HUVEC.

En la última década, se ha evidenciado que las células endoteliales pueden promover la proliferación de células tumorales y crecimiento tumoral. Además, resultados preliminares de nuestro laboratorio, mostraron que tumores formados por células PC3 tratadas con MC de células endoteliales (PC3 educadas), poseen una velocidad de crecimiento mayor que los tumores controles con células PC3 no tratadas. Además, los análisis inmunohistoquímicos realizados en los tumores de células PC3 educadas sugieren que estos tumores poseen una actividad angiogénica mayor. Considerando estos antecedentes, postulamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

Factores liberados por las células endoteliales HUVEC promueven un aumento de la capacidad pro-angiogénica de células de cáncer prostático PC3 mediante un mecanismo angiocrino.

Objetivo general

Para comprobar nuestra hipótesis nos propusimos el siguiente objetivo general: **“Determinar el efecto angiocrino de células endoteliales HUVEC sobre la capacidad pro-angiogénica de células de cáncer prostático humano PC3 a través de los marcadores moleculares angiogénicos”**

Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto angiocrino de células HUVEC sobre la expresión de factores reguladores del proceso angiogénico en la línea celular PC3.

- ✓ Selección del MC de células HUVEC para tratamiento de la línea celular PC3 mediante ensayo de viabilidad MTT.
- ✓ Análisis *in silico* de la expresión de factores angiogénicos del RNA-seq de células PC3 educadas mediante la plataforma computacional “Gene Set Enrichment analysis” (GSEA).
- ✓ Comprobar mediante RT-qPCR la expresión de los factores angiogénicos de la línea celular PC3 educadas.

2. Estudiar el efecto angiocrino de células HUVEC sobre la expresión de factores reguladores del proceso angiogénico en el modelo de xenoinjerto de la línea celular de cáncer prostático humana PC3 en ratones inmunosuprimidos del tipo NSG.

- ✓ Análisis de la expresión del factor transcripcional HIF-1 α en los tumores formados por las células PC3 educadas mediante la técnica de inmunohistoquímica.

3. Estudiar el efecto paracrino de la línea celular de cáncer prostático humano PC3 sobre la capacidad angiogénica de células HUVEC.

- ✓ Análisis de la capacidad angiogénica de las células HUVEC tratadas con MC de células PC3 educadas mediante el ensayo de formación de tubos.

Metodología

Materiales y métodos

Cultivo celular

La línea celular de cáncer de próstata que se utilizó en este estudio corresponde a las células PC3 (CRL-1435, ATCC). El medio de cultivo celular que se empleó fue el medio “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI 1640, GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, GIBCO) y con 1% de penicilina/estreptomicina (S/P, GIBCO). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Los cultivos primarios de células HUVEC fueron aislados desde cordones umbilicales frescos obtenidos a partir de fetos humanos masculinos, acorde a los reportes publicados previamente (Torres-estay et al., 2016). Los cordones umbilicales humanos se obtuvieron con la aprobación del Comité de Ética y Bioseguridad de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Todas las células HUVEC fueron cultivadas con medio endotelial humano (Human Endothelial-SFM, GIBCO) suplementado con FBS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1% y con factor endotelial al 0,4% (FE, MERCK). Todos los experimentos se llevaron a cabo en células HUVEC con pasaje de cultivo no superior a 6 (Torres-estay et al., 2016).

Preparación de los Medios Condicionados de HUVEC y PC3 educadas.

El medio condicionado (MC) de células HUVEC fue obtenido a partir del cultivo de estas células en placas de 100 mm a una confluencia celular de 90%. Las placas se lavaron 3 veces con 3 ml de PBS y se agregaron 5 ml de medio SFM con 1% de P/S y 1% de FBS. Posteriormente, se incubó por 36 horas a 37°C con 5% de CO₂ y luego se recuperó el medio. El MC células HUVEC se centrifugó a 3000 rpm por 6 minutos para eliminar restos celulares y se almacenó a -20°C.

Para la preparación de MC de células PC3 educadas se utilizaron placas de 100 mm a una confluencia celular de 50%. Se lavó la placa 3 veces con 3 ml de PBS y se agregó 50% de una mezcla de MC de tres cultivos primarios independientes de células HUVEC (28M, 36M y 38M) y 50% de RPMI con 1% de P/S y 1% de FBS. Se incubó por 48 horas a 37°C con 5% de CO₂. Luego, se lavó 3 veces con 3 ml de PBS y se agregaron 5 ml de RPMI con 1% de P/S y 1% de FBS. Se incubó por 48 horas a 37°C con 5% de CO₂ y luego se recuperó el medio. El MC de células PC3 educadas se centrifugó a 3000 rpm por 6 minutos para eliminar restos celulares y se almacenó a -20°C. Como MC control del tratamiento (PC3 sin educar) se utilizó 50% SFM y 50% de RPMI con 1% de P/S y 1% de FBS.

Cultivo celular de PC3 educadas para extracción de ARN total.

Para la preparación de las PC3 educadas con MC de células HUVEC se utilizaron placas de 100 mm a una confluencia celular de 70%. Se lavaron las placas 3 veces con 3 ml de PBS y se agregó 50% de una mezcla de MC de tres cultivos primarios independientes de células HUVEC (28M, 36M y 38M) y 50% de RPMI con 1% de P/S y 1% de FBS. Las placas se incubaron por 48 horas a 37°C con 5% de CO₂, y luego se extrajo el ARN total con RNAzol®rt (SIGMA). Como medio control se utilizó una mezcla de 50% SFM y 50% de RPMI con 1% de P/S y 1% de FBS.

Ensayo de viabilidad

El efecto del MC de células HUVEC sobre la viabilidad de las células PC3 fue medido mediante el “Kit CellTiter 96 aqueous non-Radioactive Cell Proliferation®” (Promega). Para llevar a cabo esto, se utilizaron distintos MC de células HUVEC de 6 donantes masculinos diferentes (28M, 36M, 38M, 39M, 40M y 41M). En una placa de 96 pocillos se sembraron 1000 células PC3 por pocillo y se dejó con su medio de

cultivo por 24 horas. Al día siguiente, se removió el medio y se aplicó 150 μ l de medio de tratamiento: 75 μ l de MC de células HUVEC y 75 μ l de RPMI, al 1% SFB. Para el control, se aplicó 75 μ l de SFM y 75 μ l de RPMI, al 1% SFB. A las 72 horas post tratamiento, se realizó la medición de viabilidad según procedimientos estándar (Torres-estay et al., 2016). Cabe mencionar, que el medio de tratamiento se cambió cada 48 horas.

Ensayo de formación de tubos

Para la realización del ensayo de formación de tubos en Matrigel™, se utilizaron puntas y placas de 96 pocillos previamente enfriadas a -20°C. Cada pocillo se recubrió con 50 μ l de Matrigel no polimerizado. El Matrigel se mantuvo en hielo durante todo el proceso para evitar su polimerización y se agregó con cuidado para evitar la generación de burbujas. Luego, se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 30 minutos hasta que el Matrigel solidificó. Posteriormente, se agregaron 4x10⁴ células HUVEC/pocillo. Las células se resuspendieron en 300 μ l de medio SFM suplementado con 50% de MC de células PC3 educadas. Como control del tratamiento las células HUVEC se trataron con 50% de MC de células PC3 control. Como control positivo, se utilizó medio completo SFM suplementado con 40 ng/ml de VEGF. Como control negativo se sembraron las células en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO). La mezcla se agregó a los pocillos recubiertos con Matrigel. Después de 16 horas de incubación a 37 °C y 5% CO₂, se evaluó la formación de tubos tomando fotografías con un microscopio invertido (Leica NMIL LED). Las imágenes (4X) se analizaron cuantitativamente mediante el software de análisis de imágenes "ImageJ".

Inmunohistoquímica

Se analizaron tumores prostáticos de la línea celular PC3 inyectadas en ratones NSG. A los ratones NSG se les inyectó subcutáneamente en el flanco derecho superior 0,1 ml de una suspensión de células PC3 (en PBS con 50% de Matrigel) conteniendo 1x10⁶ células PC3 para la condición control y para la condición tratamiento 1x10⁶ células PC3 pre incubadas con MC de células HUVEC por 48 horas. La inmunohistoquímica se realizó según procedimientos estándar (Torres-estay et al., 2016). El anticuerpo que se utilizó fue HIF-1 α (1:100,ab16066), seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) (1:200,

Dako). La inmunotinción en ausencia de anticuerpos primarios se utilizó como control negativo. Para el control positivo se utilizó tejido de estómago humano.

Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total, se agregó a cada placa de 100 mm 500 µl de RNAzol®rt (SIGMA). Luego, se transfirió el sobrenadante a un tubo, se añadió 200 µl de agua libre de DNAsa (DPC, Winkler), se mezcló por agitación por 15 segundos y se dejó incubando a temperatura ambiente (TA) por 15 minutos. En seguida, se centrifugó a 12.000 RCF por 15 minutos a 4 °C y se transfirió cuidadosamente el sobrenadante de ARN a un tubo nuevo (medir volumen de la alícuota). Luego se agregó el mismo volumen de la alícuota de alcohol isopropílico al 100% frío (-20°C) para precipitar el ARN y se dejó reposar durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó a 12.000 RCF durante 10 minutos a 4°C. Luego, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces el precipitado de ARN con 500 µl de etanol al 75% a -20°C. Se centrifugó a 6000 RCF durante 3 minutos a 4°C. Por último, se retiró la solución alcohólica y se solubilizó el sedimento de ARN en agua DPC a una concentración de 1-2 µg/mL para ARN mensajero. Se esperó 10 minutos para que se disolviera el precipitado de ARN y se almacenó a -80°C. Se midió la concentración de ARN utilizando un Espectrofotómetro Epoch (BioTek) a 260/280 nm.

Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADN complementario (cADN o ADNc) a partir del ARN, se eliminó del extracto de ARN el posible ADN presente en la muestra utilizando la siguiente mezcla: 1 µl de buffer DNAsa 10X (Promega), 1 µl de DNAsa 1U/µl (Promega), 1 µg de ARN y se completó a un volumen de 10 µl con agua libre de DNAsa (DPC, Winkler). Una vez realizado esto, se incubó la mezcla por 1 hora a 37 °C en un Termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf) y luego se agregó 1 µl de "DNAsa stop solution" (EDTA, Promega) a cada tubo, incubándolo por 10 minutos a 65 °C. Por último, se generó el ADNc agregando la siguiente mezcla por muestra: 2,1 µl de agua DPC, 4 µl de buffer 5X MMLV (Promega), 0,4 µl de "random primers" (Promega), 2 µl de dNTPs 10 mM (Promega), 0,5 µl de RNAsin 10 U/µl (Promega) y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa 200 U/µl (MMLV, Promega) completando un volumen final de 20 µl por tubo. Se incubó la mezcla por 60 minutos a 37 °C, luego por 15 minutos a 70 °C y 5 minutos más a 4 °C antes de almacenar el ADNc a -20 °C.

Análisis de la expresión de factores angiogénico mediante “RNA-seq”

El perfil de expresión fue realizado en colaboración con el Dr. John Ebos del “Roswell Park Comprehensive Cancer Center” en Buffalo NY. La línea celular PC3 fue tratada con una mezcla de MC de tres cultivos primarios independientes de células HUVEC (N biológico 3). El ARN fue aislado usando el “kit RNeasy” (Qiagen). 500 ng de ARN total se convirtieron en ADNc, seguido de una transcripción *in vitro* para generar ARN complementario marcado con biotina utilizando el secuenciador de última generación “Ambion Illumina TotalPrep RNA Amplification” (Ambion, Inc), como se describe en las instrucciones del fabricante. Para realizar el análisis de expresión génica se utilizó una normalización empleando como medida el FPKM (Fragmentos de transcrito por Millón de secuencias mapeadas). Posteriormente, para realizar el análisis de expresión génica diferencial se utilizó el paquete Bioconductor Limma en el programa informático de análisis estadístico "R". A continuación, se construyó un modelo empírico bayesiano basado en los datos transformados de FPKM y se comparó para generar una lista de genes de expresión diferencial (GED). Se consideraron como diferencialmente expresados (o estadísticamente significativos) los genes con un valor p ajustado inferior a 0,05 y con las veces de cambio en la expresión superior a 1,5 e inferior a -1,5. A continuación se utilizaron los GED para construir una lista pre-clasificada para el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes en la plataforma computacional “Gene Set EnrichmentAnalysis” (GSEA). Los rangos se asignaron multiplicando el $-\log$ (valor de p ajustado) y las veces de cambios, juntos. La pre-clasificación en el GSEA se realizó con la lista de vías relacionadas a angiogénesis. Los resultados del análisis de GSEA se graficaron utilizando el programa computacional “GraphPadPrism 6”.

Diseño de partidores

Para las reacciones de RT-qPCR se diseñaron partidores para cada gen en estudio, tomando en cuenta los parámetros de especificidad y la no formación de estructuras secundarias ni dímeros de partidores. Para esto se utilizó las secuencias de genes disponibles en GenBank (NCBI, NIH). Los partidores utilizados están descritos en la Tabla 1.

Gen	Partidor“Forward” (Fw)	Partidor“Reverse” (Rv)	Tm (°C)
ANG	ATTCATGGAAACAAGCGCAG	TAGCTTGCAAGTGGTGACCT	60
PDGF-A	CCGCAGTGCACACCTAGAAT	GGCACACCAACAACACAGAC	60
PDGF-B	CACTCGATCCGCTCCTTTGA	CGGGTCATGTTTCAGGTCCAA	60
TGF-β1	CGCATCCTAGACCCTTTCTCCTC	GGTGTCTCAGTATCCCACGGAAAT	60
VEGF-A	AGGAGGAGGGCAGAATCATCA	CTCGATTGGATGGCAGTAGCT	60
HIF-1α	CTCCCCTCACCCAACGAAAA	TGCAGGGTCAGCACTACTTC	60
IL-18	GACCAAGGAAATCGGCCTCT	AATATGGTCCGGGGTGCATT	60
IL-1β	GCCTGAAGCCCTTGCTGTAGT	GCGGCATCCAGCTACGAA T	60
ANGPTL4	GGATCCAGCAACTCTTCCACA	CACCTCATGGTCTAGGTGCT	60

Tabla 1: Lista de partidores de los genes angiogénicos. Los partidores de genes blancos utilizados son: angiogenina (ANG), factor de crecimiento derivado de plaqueta A y B (PDGF-A y PDGF-B, respectivamente), factor de crecimiento transformanteβ1 (TGF- β1), factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), factor inducible por hipoxia 1α (HIF-1α) interleuquina 18 (IL-18) y interleuquina 1β (IL-1β).

Análisis de la expresión de factores angiogénicos mediante RT-qPCR

En la realización de RT-qPCR se utilizó la siguiente mezcla: 1 µl de ADNc, 5 µl de “FastSYBR Green®” (Thermofisher), 1 µl de partidor Fw, 1 µl de partidor Rv y 2 µl de agua DPC, obteniendo un volumen final de 10 µl por tubo. La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo en un Termociclador “Applied biosystems StepOne”. Para la estandarización de los partidores se utilizó como control ADNc de útero donado por la Dra. Paola Casanello del laboratorio de programación y epigenética perinatal de la PUC y ADNc de la línea celular Caco-2.

Análisis estadístico

Cada ensayo se realizó por triplicado biológico. Considerando el tamaño de la muestra y el tipo de variable, se consideró la distribución normal de los datos empleando el test t para los ensayos de RT-qPCR, ensayo de formación de tubo y para el ensayo de inmunohistoquímica. El test Anova de una vía fue utilizado en el análisis del ensayo de viabilidad MTT. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

OBJETIVO 1: Estudiar el efecto angiocrino de células HUVEC sobre la expresión de factores reguladores del proceso angiogénico en la línea celular PC3.

Obtención y selección de los MC de células HUVEC para el tratamiento de la línea celular PC3 mediante ensayo de viabilidad MTT

El primer hito para desarrollar esta investigación fue obtener y seleccionar los MC de células HUVEC para realizar el tratamiento *in vitro* de las células PC3 para su posterior análisis. Para llevar a cabo esto, se realizó un ensayo de viabilidad de las células PC3 tratadas con distintos MC de células HUVEC, entre los cuales estaban los 3 MC (28M, 36M y 38M) utilizados en los ensayos preliminares *in vivo* de nuestro laboratorio. Se realizó el ensayo de viabilidad mediante la técnica colorimétrica MTT, observándose que todos los MC de células HUVEC analizados, a excepción de la muestra del donante 39M y 41M, aumentaron significativamente la viabilidad de las células PC3 al ser comparadas con la situación control (100%) (Figura 6). Por lo tanto, al verificar que los tres MC utilizados en el ensayo *in vivo*, 28M, 36M y 38M aumentaban significativamente la viabilidad de PC3, se seleccionaron para producir el MC a utilizar en los ensayos de esta investigación.

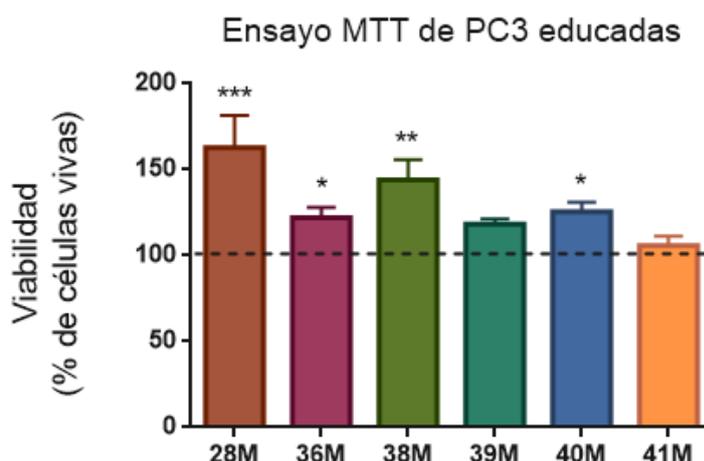


Figura 6: Efecto angiocrino de los MC de células HUVEC en la viabilidad de PC3. Los 6 MC de células HUVEC, de distintos donadores, fueron usados para ver su capacidad independiente de influenciar en la viabilidad de las células PC3. Los MC de HUVEC de 28M,

36M, 38M y 40M aumentaron significativamente la viabilidad de PC3 versus el control. (n=3; *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, test “oneway” Anova).

Análisis *in silico* del “RNA-seq” de la línea celular PC3 educadas mediante la plataforma computacional “Gene Set Enrichment analysis” (GSEA).

Para dilucidar las posibles vías moleculares activadas por el MC de células HUVEC, se analizaron los cambios de expresión de los ARN mensajeros (RNAm) comparando las células PC3 educadas y las células PC3 sin educar, a través de un análisis transcriptómico en colaboración con el Dr. John Ebos del Departamento de Genética y Genómica de “Roswell Park Comprehensive Cancer Center” en Buffalo, NY. El estudio de “RNA-seq” se llevó a cabo en células PC3 educadas y en células PC3 control (tratadas con SFM). Para determinar el conjunto de genes que están diferencialmente expresados en la condición PC3 educadas, con respecto al control, se realizó un análisis utilizando la plataforma computacional GSEA. El análisis del conjunto de genes secuenciados se comparó con la base de datos de la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG), con lo cual se obtuvo un subconjunto de genes que cambian su expresión y se encuentran relacionados con las vías de señalización angiogénica (Figura 7). De este subconjunto de genes, se realizó una segunda selección de los genes más relevantes de acuerdo a las evidencias bibliográficas (Fahey et al., 2019; Mittal et al., 2014; Pardali & Dijke, 2009; Semenza, 2003; Tello-Montoliu A et al., 2006). Los 9 genes seleccionados fueron los que codifican para las moléculas pro-angiogénicas VEGF-A, PDGF-A, PDGF-B, HIF-1α, TGF-β1, ANG, IL-1β; y las moléculas de comportamiento dual (depende del contexto celular si actúan como factores pro o anti angiogénicos) IL-18 y ANGPTL4 (Palma et al., 2013; Tan et al., 2012).

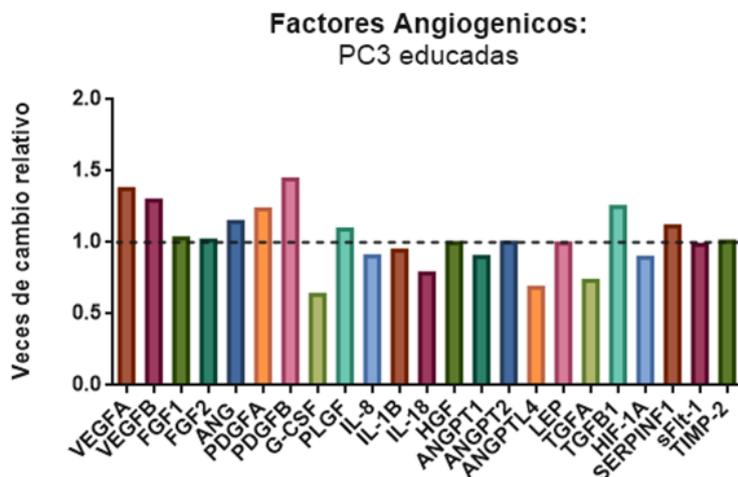


Figura 7: Factores angiogénicos obtenidos del “RNA-seq” de las células PC3 educadas. Las veces de cambio de cada gen fue graficado en función al control, donde las veces de cambios para la condición control es igual a 1 (línea punteada). No se realizó un análisis estadístico ya que este ensayo se realizó con un N biológico igual a 1 y con triplicado técnico por condición.

Comprobar mediante RT-qPCR la expresión de los factores angiogénicos de la línea celular PC3 educadas

Para desarrollar este hito, en primer lugar, se debieron definir y estandarizar los partidores a utilizar en los ensayos de RT-qPCR. Se sintetizaron dos pares de partidores para 8 de los 9 genes a estudiar, ya que los partidores del gen IL-1 β y los genes normalizadores ARN ribosómico 18s (18s) y la enzima HPRT1; ya se encontraban estandarizados en el laboratorio. Con ello, se procedió a realizar la estandarización de estos partidores mediante PCR convencional utilizando como muestra control ADNc de útero (Figura 8). El tamaño del producto amplificado para cada pareja de partidores se describe en la tabla 2.

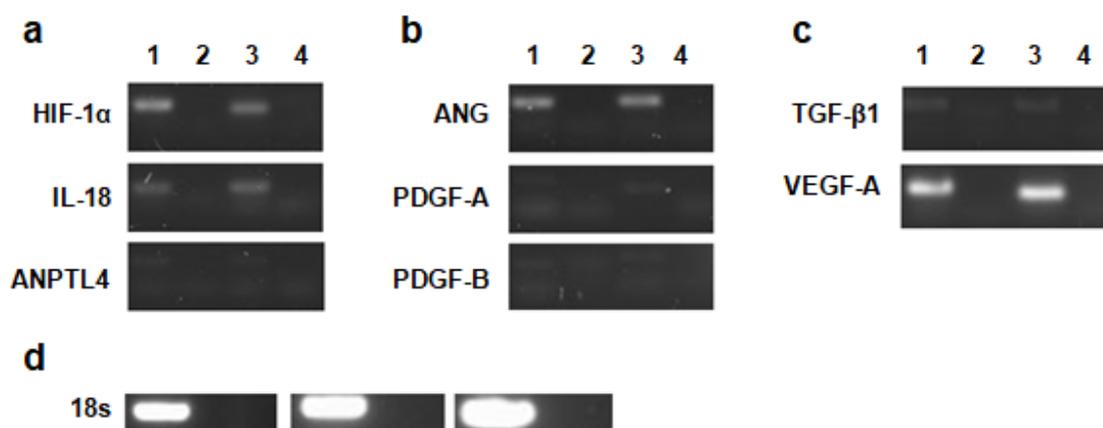


Figura 8: Gel de agarosa de productos de PCR para factores angiogénicos. Cada par de partidores (carriles 1-2 y 3-4) para los distintos genes fueron analizados mediante PCR utilizando ADNc de útero como muestra (carril 1 y 3). Los productos de PCR se analizaron en 3 gels diferentes. A) para los genes HIF-1 α , IL-18 y ANGPTLA. B) para los genes ANG, PDGF-A y PDGF-B. C) para los genes TGF- β 1 y VEGF-A. Como control negativo se utilizó DPC (carril 2 y 4). D) Como control positivo de la técnica se utilizó el gen de referencia 18s para cada gel (a, b y c), respectivamente.

Tamaño de los productos de PCR para los factoresangiogénicos			
(1-2) HIF-1 α	102 pb	(1-2) PDGF-A	130 pb
(3-4) HIF-1 α	80 pb	(3-4) PDGF-A	81 pb
(1-2) IL-18	71 pb	(1-2) PDGF-B	92 pb
(3-4) IL-18	74 pb	(3-4) PDGF-B	128 pb
(1-2) ANGPTL4	119 pb	(1-2) TGF- β 1	133 pb
(3-4) ANGPTL4	125 pb	(3-4) TGF- β 1	133 pb
(1-2) ANG	107 pb	(1-2) VEGF-A	109 pb
(3-4) ANG	114 pb	(3-4) VEGF-A	76 pb

Tabla 2: Tamaño de la secuencia nucleotídica (pares de base, pb) de los productos de PCR amplificados para cada par de partidores. La enumeración 1-2 y 3-4 corresponde a los carriles utilizados en el gel de agarosa para los productos de PCR de cada par de partidores.

Una vez realizado esto, se procedió a estandarizar los pares de partidores para ser utilizados en los ensayos de RT-qPCR. Utilizando los ADNc de útero y de la línea celular CACO-2 como muestras controles, se determinó la eficiencia y el coeficiente de correlación (R^2) para los 8 partidores seleccionados (Tabla 3). La obtención de estos parámetros se generó mediante los datos entregados por la linealización de los Ct obtenidos versus el Log de la concentración de la muestra (Figura 9). La eficiencia se cálculo de la siguiente manera: $E(\%) = (10^{(-1/pendiente)} - 1) \times 100$.

Nombre del Gen	Eficiencia del Partidor (%)	Coficiente de correlación (R^2)
VEGF-A	81,2	0,9764
HIF-1 α	84,6	0,9960
ANG	86,7	0,9979
PDGF-A	83,5	0,9978
PDGF-B	98,9	0,9909
TGF β 1	100,9	0,9999
IL-18	98,9	0,9914
ANGPTL-4	98,5	0,9192

Tabla 3: Estandarización de los partidores para factores angiogénicos. Mediante RT-qPCR se obtuvo las eficiencias y coeficientes de correlación para cada partidor con muestra de ADNc de útero y CACO-2 (n=1).

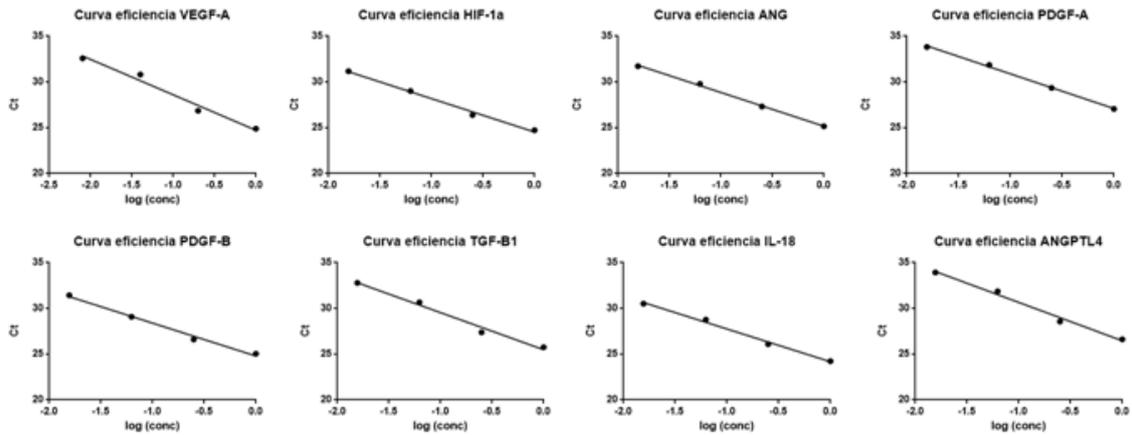


Figura 9: Curva de eficiencia para cada par de partidores de los genes de factores angiogénicos. La eficiencia para cada par de partidores se obtuvo mediante la siguiente fórmula: $E(\%) = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) \times 100$, ($n=1$).

Una vez definidas las condiciones experimentales, se procedió a obtener RNA de células PC3 educadas para realizar el ensayo de RT-qPCR, con la finalidad de corroborar los cambios de expresión génica obtenidos en el estudio de “RNA-seq”. Para ello, se realizó el cultivo celular de las células PC3 tratadas por 48 horas con la mezcla de MC de células HUVEC, con lo que se obtuvieron células PC3 educadas. Luego, se extrajo el ARN total y se analizó su integridad mediante un gel de agarosa al 1% (Figura 10).

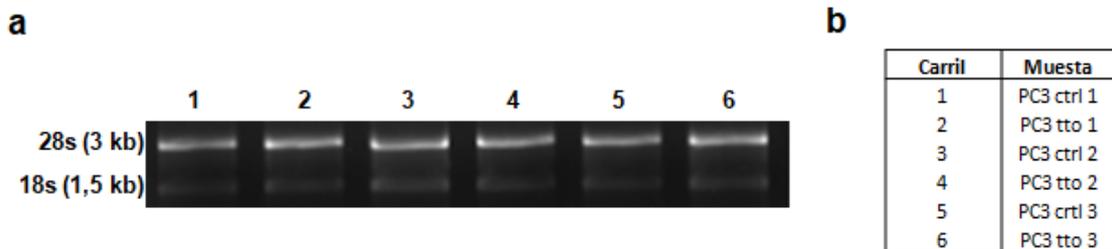


Figura 10: Gel de integridad de ARN total de células PC3 educadas. A) Mediante una electroforesis con un gel de agarosa al 1% no denaturante se obtuvo los fragmentos de las subunidades de ARN, 28s y 18s, las cuales tienen un ratio de intensidad cercano a 2:1, respectivamente. B) El orden de los carriles están descritos con sus respectivas muestras control (ctrl) y tratamiento (tto) de cada triplicado biológico 1, 2 y 3 ($n=3$).

Por último, una vez obtenido el ARN de las células PC3 educadas, se procedió a sintetizar el ADNc y a realizar el RT-qPCR para analizar la cantidad de transcripto de los 9 genes seleccionados, utilizando como gen de referencia la enzima Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1). Según los datos obtenidos, de todos los genes pro-angiogénicos analizados solo aumentaron significativamente

VEGF-A, HIF-1 α e IL-1 β ; y de los factores de comportamiento dual se observó un aumento significativo de la molécula ANGPTL-4 (Figura 11).

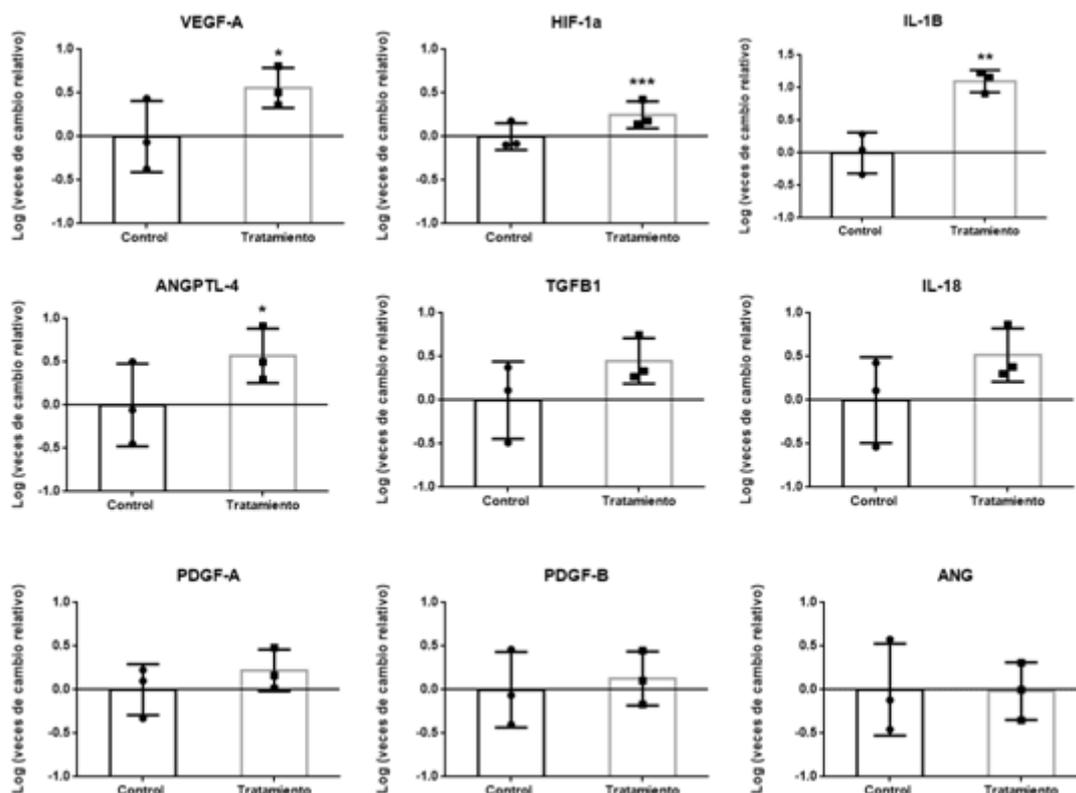


Figura 11: Expresión de factores angiogénicos de las células PC3 educadas. De todos los factores analizados, solo los factores VEGF-A (*p<0,05), HIF-1 α (**p<0,001), IL-1 β (**p<0,01) y ANGPTL-4 (*p<0,05) aumentaron significativamente con respecto al control (Test t, n=3).

OBJETIVO 2: Estudiar el efecto angiocrino de células HUVEC sobre la expresión de factores reguladores del proceso angiogénico en el modelo de xenoinjerto de la línea celular de cáncer prostático humana PC3 en ratones inmunosuprimidos del tipo NSG.

En los antecedentes preliminares obtenidos en nuestro laboratorio utilizando el modelo *in vivo* de xenoinjerto de la línea celular PC3 inyectadas en ratones NSG, se observó un aumento del marcador endotelial CD31 y el factor VEGF en los tumores formados por células PC3 educadas en comparación con las células PC3 no tratadas. Estos resultados sugirieron un aumento de la capacidad angiogénica mediada por el tratamiento de medio condicionado de células HUVEC. Para profundizar en los hallazgos obtenidos en el experimento mencionado, se analizó la expresión del factor transcripcional HIF-1 α en los tumores (Figura 12). Este factor promueve la transcripción de genes pro-angiogénicos, por lo que es clave en el proceso de

angiogénesis tumoral (Semenza, 2003; Xu et al., 2005). Nuestros resultados en el ensayo de inmunohistoquímica muestran que los tumores formados de PC3 educadas, presentan un leve aumento en los niveles de expresión de HIF-1 α . No obstante, nuestro análisis de cuantificación de la cantidad de pixeles por área de tinción en los tejidos analizados, no mostró un cambio significativo entre la condición PC3 educadas y PC3 control.

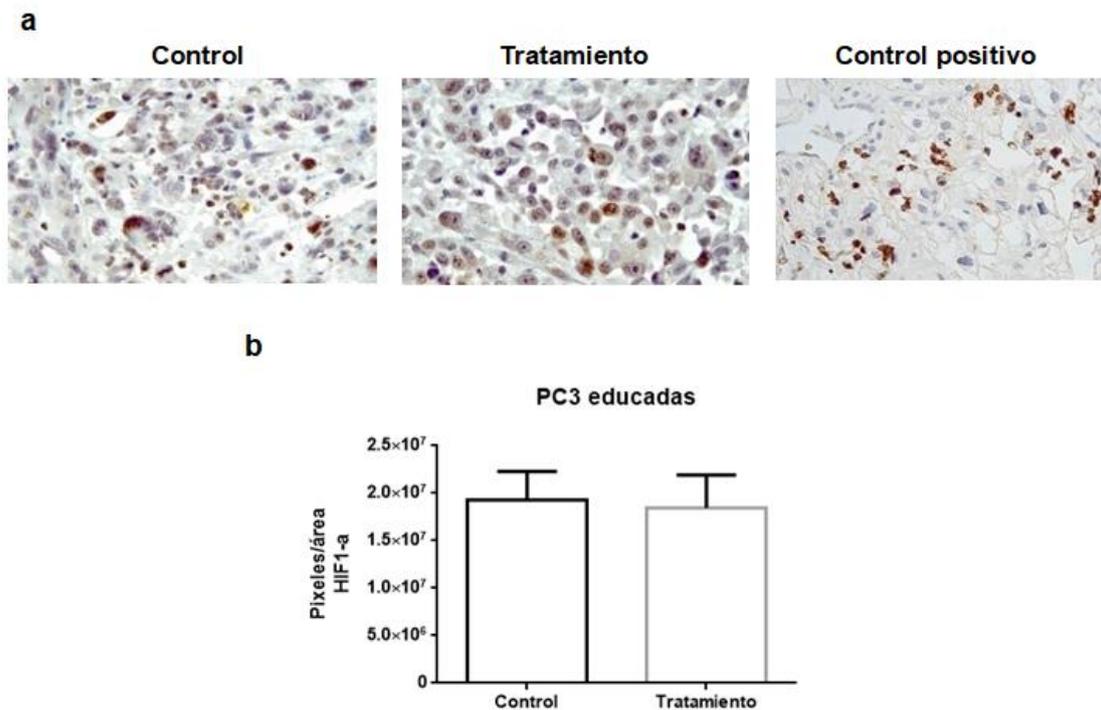


Figura 12: Pre tratamiento de PC3 no aumento la expresión del factor HIF-1 α en tumores de xenoinjerto en ratón. A) Imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico para el marcado HIF-1 α . Las condiciones del modelo de xenoinjerto son: PC3 inyectadas solas (control) y PC3 pre tratadas con MC de células HUVEC por 48 horas antes de inyectar al ratón (tratamiento). B) Cuantificación de la marca inmunológica de HIF-1 α en término cantidad de pixeles por área de tinción. Como control positivo se utilizó tejido de estómago humano. Test t y n=5.

OBJETIVO 3: Estudiar el efecto paracrino de la línea celular de cáncer prostático humano PC3 sobre la capacidad angiogénica de células HUVEC.

Para analizar el efecto que tiene el tratamiento del MC de células HUVEC sobre la línea celular PC3 en términos de agresividad, específicamente en aumentar su capacidad pro-angiogénica, se realizó un ensayo *in vitro* de formación de tubos utilizando cultivos primarios de células HUVEC tratadas con MC de células PC3

educadas (Figura 13). Nuestros resultados evidenciaron visual y estadísticamente que las PC3 educadas son capaces de aumentar la capacidad de las HUVEC de formar tubos, es decir, de aumentar su actividad angiogénica, mediante un mecanismo paracrino. El ensayo fue cuantificado determinando la cantidad de tubos formados y la longitud total de la red normalizado con respecto a la condición control (MC de células PC3 no educadas). Ambos parámetros aumentaron significativamente en la condición experimental.

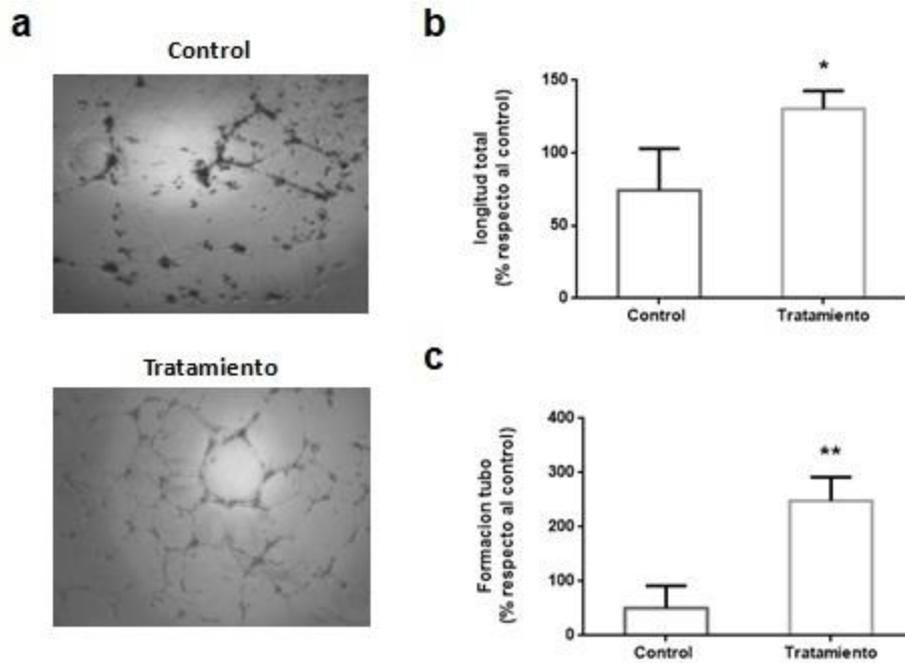


Figura 13: Las células PC3 educadas mediante un mecanismo paracrino aumentan tanto la formación de tubo como la longitud total de la red. A) Imagen representativa del ensayo de formación de tubo en las dos condiciones de tratamiento para las células HUVEC: control (tratadas con MC de células PC3 sin educar) y tratamiento (tratadas con MC de células PC3 educadas). B) Cuantificación de la formación de tubo en % con respecto al control. C) Cuantificación de la longitud total de la red en % con respecto al control. El control se realizó utilizando MC de PC3 sin educar. El control positivo del ensayo se utilizó 40 µg/ml de VEGF. * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$, Test t y $n=3$.

Discusión

El hecho de que la angiogénesis sea una característica distintiva en el desarrollo y progresión del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2000), ha impulsado considerablemente el esfuerzo de determinar las vías moleculares de angiogénesis, con la finalidad de controlar la progresión tumoral (Carmeliet & Jain, 2000). Incluyendo, las vías paracrinas de comunicación celular que activan la angiogénesis y las vías angiocrinas que favorecen la proliferación tumoral (Butler et al., 2010; Pasquier et al., 2020). Si bien, en la literatura existe información parcializada de cómo este mecanismo angiocrino pudiese potenciar la progresión en ciertos tipos de cánceres, la información en CaP es muy limitada (Pasquier et al., 2020). Por lo tanto, se requieren mayores estudios que permitan entender el efecto de la comunicación angiocrina de las CEs en la agresividad de CaP; teniendo en consideración además, que las terapias anti-angiogénicas no son efectivas en CaP (Bilusic & Wong, 2014). En este trabajo propusimos responder si las CEs son capaces de promover la actividad pro-angiogénica de células de CaP mediante una estimulación angiocrina, utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Nuestros resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de RT-qPCR mostraron que a través de una señal angiocrina las células de CaP aumentan la expresión de los genes pro-angiogénicos VEGF-A, HIF-1 α , IL-1 β y ANGPTL-4. Sin embargo, no encontramos cambios en la expresión de los genes PDGF-A, PDGF-B, IL-18, ANG y TGF- β 1. Estos resultados concuerdan parcialmente con los resultados previos obtenidos en el estudio de "RNA-seq", ya que en este, no se observó cambios en la expresión de los genes VEGF-A, HIF-1 α , IL-1 β y ANGPTL-4. La discrepancia de estos resultados puede estar dada por múltiples motivos, como por ejemplo, la desigualdad en el n biológico utilizado entre ambas técnicas moleculares, los pasajes utilizados en la línea celular PC3, diferencias en el MC debido al pasaje de las células HUVEC con el cual se obtuvo y las diferencias en sensibilidad de las dos técnicas moleculares utilizadas. Estudios anteriores han demostrado que las células HUVEC expresan y secretan una gran variedad de factores de crecimiento y/o citoquinas capaces de inducir, por ejemplo, la expresión de factores asociados a invasión y metástasis en cáncer de hígado (Y. Wang et al., 2013) y en CaP (X. Wang et al., 2013); sin embargo, aún se desconoce la capacidad de las células HUVEC en promover la expresión de factores angiogénicos en líneas celulares de cáncer. Tomando en cuenta el secretoma del MC de células HUVEC obtenidos en nuestro laboratorio (Torres-estay et al., Manuscrito en revisión), son múltiples las interrogantes que nos planteamos al observar el efecto

angiocrino en el aumento de la expresión de los transcritos antes descritos. Se sabe que HIF-1 α es un factor inducido por hipoxia pero también puede ser inducido por factores de crecimientos en condiciones de normoxia (Semenza, 2003). Asimismo, se ha observado que en CaP (Zhong et al., 2000), y en cáncer de mama (Xu et al., 2005), este efecto paracrino ocurre solo a nivel de estabilización de la proteína HIF-1 α , pero no a nivel de transcritos ya que se mantiene estable. De acuerdo a nuestros resultados, se sugiere la existencia de moléculas solubles presentes en el MC de células HUVEC que son capaces de estimular las células PC3 y aumentar los transcritos para HIF-1 α , convirtiéndose en un área interesante a explorar. Por otra parte, la expresión génica de VEGF-A también es regulado por hipoxia (principalmente por HIF-1 α) y por factores de crecimientos (Ferrara et al., 2003). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el MC de células HUVEC contiene interleuquina 6 (Torres-estay et al., Manuscrito en revisión), citoquina ampliamente estudiada en modelos de cáncer que actúa como inductor en la expresión del factor VEGF (factor esencial para la inducción de la angiogénesis) (Johnson et al., 2018). Esto sugiere una posible correlación entre estos dos factores en la sobre-expresión de VEGF-A en nuestro modelo experimental de células PC3 educadas. Otra citoquina que fue sobre-expresada en nuestro modelo experimental fue IL-1 β , la cual es una potente interleuquina pro-inflamatoria multifuncional liberada por las células que componen el MAT y que participa tanto en la estimulación de la proliferación, invasión y angiogénesis tumoral (Fahey et al., 2019). Finalmente, la sobre-expresión del factor angiogénico ANGPTL-4 se ha observado en varios modelos tumorales humanos y uno de los factores transcripcionales que es capaz de inducir su expresión es HIF-1 α (Zhu et al., 2011). Zhu y colaboradores sugirieron una estrecha correlación entre la expresión de RNAm de ANGPTL-4 y la expresión de RNAm de HIF-1 α en un modelo de cáncer de lengua (Zhu et al., 2011). Lo descrito anteriormente, nos sugiere que probablemente el aumento de RNAm de ANGPTL-4 en células PC3 educadas podría estar relacionado con el aumento de la expresión del RNAm de HIF-1 α . Sin embargo, es necesario realizar más experimentos que puedan comprobar este hecho.

Para evaluar en mayor profundidad el efecto angiocrino del MC de células HUVEC en células PC3 utilizamos el modelo *in vivo* de xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos. Estos modelos se han utilizado ampliamente para estudiar la de comunicación paracrino entre CEs y el cáncer (Lee et al., 2014; X. Wang et al., 2013). A pesar que la línea celular PC3 es una línea derivada de células de CaP altamente agresiva y muestran un fenotipo pro-angiogénico (Baci et al., 2019), el efecto angiocrino de las CEs es capaz de aumentar aún más este fenotipo, efecto

observado en nuestro ensayo *in vitro* e *in vivo*, al observar en este último un aumento en la DMV y la expresión de VEGF (Torres-estay et al., Manuscrito en revisión). Un perfil angiogénico puede evaluarse más a fondo utilizando además anticuerpos monoclonales contra HIF-1 α (Lekas et al., 2006). Lekas y colaboradores analizaron la expresión de HIF-1 α y VEGF en biopsias de tejido prostático humano y observaron que hay una correlación entre la sobre-expresión en la inmunotinción para HIF-1 α y VEGF en tejido de CaP en comparación con el tejido de próstata normal (Lekas et al., 2006). Resultado similar se ha observado en cáncer de mama (Bos et al., 2001). Nuestros resultados de inmunohistoquímica sugirieron que hubo un aumento en la expresión de HIF-1 α en los tumores de células PC3 educada en comparación a los tumores de PC3 no educadas, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas. Esto sugiere que el fenotipo pro-angiogénico de los tumores en el modelo *in vivo* podrían estar modulado por otras vías de señalización, por ejemplo, VEGF, y que no convergen con el factor transcripcional HIF-1 α . Sin embargo, debido a la diferencia de lo observado en la inmunohistoquímica y el resultado del análisis estadístico de este estudio, es recomendable un posterior análisis más exhaustivo para determinar si realmente hay o no un efecto angiocrino en este modelo de CaP. Esto porque la gran mayoría de las muestras mostraron un aumento visible, y el hecho de que no alcance significancia estadística podría estar dado por el reducido número de muestras o el efecto de enmascaramiento que pudiesen tener las zonas hipóxicas con alta expresión de HIF-1 α sobre el efecto del MC.

Para el estudio del efecto paracrino en el proceso de angiogénesis en cáncer se ha utilizado ampliamente MC de células cancerosas para evaluar su efecto paracrino en la capacidad de las CEs en formar tubos (Aird, 2009). En nuestros resultados, se observó que el efecto paracrino de las células PC3 educadas aumentó la capacidad angiogénica del cultivo primario HUVEC, evaluado en términos de formación de tubos y largo total de la red (Godoy et al., 2008; Torres-estay et al., 2016). Este estudio fue concordante con el obtenido en un trabajo realizado con MC de cáncer de colon, que expresa VEGF-A, el cual aumento la capacidad angiogénica de las células HUVEC, en termino de formación de tubos (Delle Monache et al., 2020), sugiriendo en nuestro modelo de estudio que el aumento de la capacidad pro-angiogénica de las células de CaP aumenta la actividad angiogénica de las células HUVEC.

Conclusión

Nuestros resultados mostraron que el efecto angiocrino de las células HUVEC aumenta el fenotipo pro-angiogénico en la línea celular de CaP, PC3, ya que aumenta la expresión de los genes pro-angiogénicos VEGF-A, HIF-1 α , IL-1 β y ANGPTL-4 (Figura 14). Sin embargo, en el modelo *in vivo* HIF-1 α podría no estar modulando el aumento de la angiogénesis. Por último, mediante un mecanismo paracrino las células PC3 educadas modifican las características y/o capacidades de las células HUVEC, ya que aumentaron su capacidad de formación de tubos (Figura 14). Estos hallazgos, sustentan el hecho de que existe una comunicación constante y bidireccional entre las células tumorales y las células endoteliales.

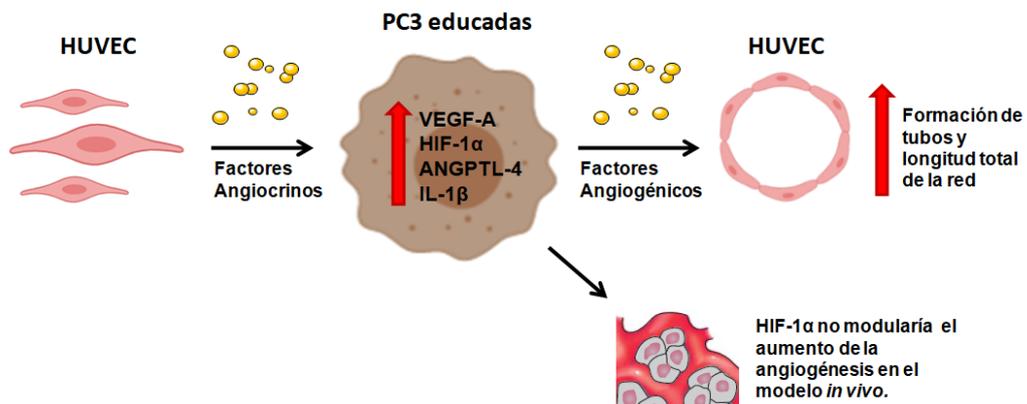


Figura 14: Esquema de los resultados obtenidos en esta investigación

Bibliografía

- Abdollahi, A., & Folkman, J. (2010). Evading tumor evasion : Current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 13(1–2), 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2009.12.001>
- Aird, W. C. (2009). Molecular heterogeneity of tumor endothelium. *Cell and Tissue Research*, 335, 271–281. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0672-y>
- Arora, K., & Barbieri, C. E. (2018). Molecular Subtypes of Prostate Cancer. *Current Oncology Reports*, 20(8), 58. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0707-9>
- Baci, D., Bruno, A., Cascini, C., Gallazzi, M., Mortara, L., Sessa, F., Pelosi, G., Albini, A., & Noonan, D. M. (2019). Acetyl-L-Carnitine downregulates invasion (VEGF , CXCL8) pathways in prostate cancer cells : rationale for prevention and interception strategies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(464), 1–17.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>
- Bilusic, M., & Wong, Y. (2014). Anti-angiogenesis in prostate cancer : knocked down but not out. *Asian Journal of Andrology*, 16, 372–377. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.125903>
- Bos, R., Zhong, H., Semenza, G. L., Herbert, M., Abeloff, M. D., Simons, W., & Diest, P. J. Van. (2001). Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1_ During Breast Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), 309–314.
- Butler, J. M., Kobayashi, H., & Rafii, S. (2010). Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), 138–146. <https://doi.org/10.1038/nrc2791>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>
- Chiarugi, P., Paoli, P., & Cirri, P. (2014). Tumor microenvironment and metabolism in prostate cancer. *Seminars in Oncology*, 41(2), 267–280. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.03.004>
- Corn, P. G. (2012). The tumor microenvironment in prostate cancer: Elucidating molecular pathways for therapy development. *Cancer Management and Research*, 4(1), 183–193. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S32839>
- Delle Monache, S., Cortellini, A., Parisi, A., Pulcini, F., Martellucci, S., Mei, C., Danubio, M. E., Mattei, V., Angelucci, A., & Ficorella, C. (2020). Expression of pro-angiogenic factors as potential biomarkers in experimental models of colon cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(6), 1427–1440. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03186-x>
- Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Zhu, Z., Wu, Y., Witte, L., Hicklin, D. J., Tateno, M., Bohlen, P., Moore, M. A. S., & Rafii, S. (2001). Inhibition of both paracrine and

- autocrine VEGF \rightarrow VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *PNAS*, 98(19), 10857–10862.
- Fahey, E., Doyle, S. L., & Doyle, S. L. (2019). IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Frontiers in Immunology*, 10, 1426. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01426>
- Ferrara, N., Gerber, H., & Lecouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669–676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(4), 273–286. <https://doi.org/10.1038/nrd2115>
- Franses, J. W., & Edelman, E. R. (2011). The evolution of endothelial regulatory paradigms in cancer biology and vascular repair. *Cancer Research*, 71(24), 7339–7344. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1718>
- Godoy, A., Watts, A., Sotomayor, P., Montecinos, V. P., Huss, W. J., Onate, S. A., & Smith, G. J. (2008). Androgen Receptor Is Causally Involved in the Homeostasis of the Human Prostate Endothelial Cell. *Endocrinology*, 149(6), 2959–2969. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1078>
- Goldgar, D. E., Easton, D. F., Cannon-albright, L. A., & Skolnick, M. H. (1994). Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(21), 1600–1608. <https://doi.org/10.1093/jnci/86.21.1600>
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime : Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 86, 353–364.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Johnson, D. E., O'Keefe, R. A., & Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(4), 234–248. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.8>
- Joyce, J. A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 7(6), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.05.024>
- Krušlin, B., Ulamec, M., & Tomas, D. (2015). Prostate cancer stroma : an important factor in cancer growth and progression. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(2), 1–8. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2015.449>
- Lee, E., Pandey, N. B., & Popel, A. S. (2014). Lymphatic endothelial cells support tumor growth in breast cancer. *Scientific Reports*, 4(5853), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep05853>
- Lekas, A., Lazaris, A. C., Deliveliotis, C., Chrisofos, M., Zoubouli, C., Lapas, D., Papatomas, T., Fokitis, I., & Nakopoulou, L. (2006). *The Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1) and Angiogenesis Markers in Hyperplastic and Malignant Prostate Tissue*. 2994, 2989–2993.
- Levesque, C., & Nelson, P. S. (2018). Cellular Constituents of the Prostate Stroma: Key Contributors to Prostate Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(8), a030510. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030510>
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., & Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer - analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England Journal of Medicine*, 343(2), 78–85.

- <https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430201>
- Litwin, M. S., & Tan, H. J. (2017). The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 317(24), 2532–2542. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>
- Minsal. (2018). Nacional Cáncer. *Plan Nacional de Cáncer 2018-2028, Documento de Consulta Pública. Minsal 2018.*
- Mittal, K., Ebos, J., & Rini, B. (2014). Angiogenesis and the tumor microenvironment: Vascular endothelial growth factor and beyond. *Seminars in Oncology*, 41(2), 235–251. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.02.007>
- Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 839–849. <https://doi.org/10.1038/nrc1477>
- Palma, G., Barbieri, A., Bimonte, S., Palla, M., Zappavigna, S., Caraglia, M., Ascierto, P. A., Ciliberto, G., & Arra, C. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Interleukin 18 : Friend or foe in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1836(2), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.09.001>
- Pardali, E., & Dijke, P. (2009). Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Frontiers in Bioscience*, 14, 4848–4861.
- Pasquier, J., Ghiabi, P., Chouchane, L., Razzouk, K., Rafii, S., & Rafii, A. (2020). Angiocrine endothelium : from physiology to cancer. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02244-9>
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10(2), 63–89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
- Ritch, C. R., & Cookson, M. S. (2016). Advances in the management of castration resistant prostate cancer. *BMJ*, 17(355), i4405. <https://doi.org/10.1136/bmj.i4405>
- Russo, G., Mischi, M., Scheepens, W., Rosette, J. J. De, & Wijkstra, H. (2012). Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. *BJU International*, 110(11 Pt C), E794-808. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11444.x>
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 721–732. <https://doi.org/10.1038/nrc1187>
- Shen, M., & Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development*, 24(212), 1967–2000. <https://doi.org/10.1101/gad.1965810.GENES>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1003, 71–91. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8>
- Tan, M. J., Teo, Z., Sng, M. K., Zhu, P., & Tan, N. S. (2012). Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer. *Molecular Cancer Research*, 10(6), 677–688. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0519>
- Tello-Montoliu A, Patel J. V, & H, L. G. Y. (2006). Angiogenin : a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4, 1864–1874. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01995.x>
- Torres-estay, V., Carren, D., Watts, A., San, I. F., Viviana, F., Sotomayor, P. C., Ebos, J., Smith, G. J., & Godoy, A. S. (2016). Androgens modulate male-derived endothelial cell homeostasis using androgen receptor-dependent and receptor-independent mechanisms. *Angiogenesis*, 20(1), 25–38. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9525-6>
- Tuxhorn, J. A., Ayala, G. E., & Rowley, D. R. (2001). Reactive stroma in prostate cancer progression. *The Journal of Urology*, 166(6), 2472–2483.
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews. Urology*, 13(7), 379–386.

- <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & Depinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes and Development*, 32(17–18), 1105–1140. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
- Wang, X., Lee, S. O., Xia, S., Jiang, Q., Luo, J., Li, L., Yeh, S., & Chang, C. (2013). Endothelial cells enhance prostate cancer metastasis via IL-6→androgen receptor→TGF-β→MMP-9 signals. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(6), 1026–1037. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0895>
- Wang, Y., Dong, Y., Wang, W., Xie, X., Wang, Z., Chen, R., & Chen, J. (2013). Vascular endothelial cells facilitated HCC invasion and metastasis through the Akt and NF-κB pathways induced by paracrine cytokines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 32(52), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-51>
- Weidner, N., Carroll, P. R., Flax, J., Blumenfeld, W., & Folkman, J. (1993). Tumor Angiogenesis Correlates with Metastasis in Invasive Prostate Carcinoma. *American Journal of Pathology*, 143(2), 401–409.
- Xu, Q., Briggs, J., Park, S., Niu, G., Kortylewski, M., Zhang, S., Gritsko, T., Turkson, J., Kay, H., Semenza, G. L., Cheng, J. Q., Jove, R., & Yu, H. (2005). Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene*, 24(36), 5552–5560. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208719>
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M., Simons, J. W., & Semenza, G. L. (2000). Modulation of Hypoxia-inducible Factor 1_α Expression by the Epidermal Growth Factor / Phosphatidylinositol 3-Kinase / PTEN / AKT / FRAP Pathway in Human Prostate Cancer Cells : Implications for Tumor Angiogenesis and Therapeutics 1. *Cancer Research*, 60, 1541–1545.
- Zhu, P., Tan, M. J., Huang, R., Tan, C. K., Chong, H. C., Pal, M., Ren, C., Lam, I., Boukamp, P., Pan, J. Y., Tan, S. H., Kersten, S., Li, H. Y., Ding, J. L., & Tan, N. S. (2011). Article Angiopoietin-like 4 Protein Elevates the Prosurvival Intracellular O₂ – : H₂O₂ Ratio and Confers Anoikis Resistance to Tumors. *Cancer Cell*, 19(3), 401–415. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.018>