

Perfil de expresión de quimiocinas proinflamatorias en líneas celulares de cáncer de próstata y en suero de pacientes con hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata

Marlon Rafael Charris Rincón



**Universidad de Cartagena
Facultad de Medicina
Área de Bioquímica
Maestría en Bioquímica
Cartagena, Colombia, 2015**

Perfil de expresión de quimiocinas proinflamatorias en líneas celulares de cáncer de próstata y en suero de pacientes con hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata

Marlon Rafael Charris Rincón

Director de tesis

Niradiz Reyes Ramos, PhD



**Universidad de Cartagena
Facultad de Medicina
Área de Bioquímica
Maestría en Bioquímica
Cartagena, Colombia, 2015**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Nombre y firma del Jurado

Nombre y firma del Jurado

**Nombre y firma
Coordinador de Maestría**

Dedicatoria

A la excelsa trinidad

A mi madre querida

A mi amada sobrina Darlis que duerme en el señor

A mis familiares

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran conflictos de intereses

FINANCIACION:

Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Cartagena.

Colciencias

Perfil de expresión de quimiocinas proinflamatorias en líneas celulares de cáncer de próstata y en suero de pacientes con hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata

Marlon Rafael Charris Rincón¹, Niradiz Reyes Ramos²

1. Lic. Biología y Química, Candidato a Magíster en Bioquímica.

2. PhD. Director Grupo de Genética y Biología molecular. Universidad de Cartagena.

PERFIL DE EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS PROINFLAMATORIAS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA Y EN SUERO DE PACIENTES CON HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA Y CÁNCER DE PRÓSTATA

Resumen:

La inflamación prostática asintomática es de considerable importancia en la investigación biomédica debido a su asociación con dos condiciones urológicas comunes en el adulto mayor: el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna. De otra manera, los mecanismos celulares y moleculares involucrados con la hiperplasia benigna y el cáncer de próstata no son del todo comprendidos, aunque las quimiocinas han mostrado tener un papel clave en el establecimiento de las mismas. Se encontró un perfil de expresión diferencial de quimiocinas proinflamatorias en sobrenadantes y exosomas de líneas celulares de cáncer de próstata con distintos potenciales metastásico. Dentro de este se encontraron quimiocinas no descritas previamente en el cáncer de próstata, las cuales han evidenciado participar en procesos de inmunología tumoral y metástasis en otros tipos de tumores sólidos. De otra parte los pacientes con hiperplasia prostática benigna mostraron un moderado perfil inflamatorio dominado por las quimiocinas CCL5 y CCL22.

Palabras clave: Quimiocinas, Adenocarcinoma prostático, Hiperplasia prostática benigna.

EXPRESSION PROFILES OF PROINFLAMMATORY CHEMOKINES IN PROSTATE CANCER CELL LINES AND PATIENTS WITH BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AND PROSTATE CANCER

Abstract:

Asymptomatic prostate inflammation is of considerable importance in biomedical research because of its association with two common urological conditions in the elderly: prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. Otherwise, the cellular and molecular mechanisms involved with BPH and prostate cancer are not completely understood, although chemokines have been shown play a key role in establishing the same. A profile of differential expression of proinflammatory chemokines in supernatants of cell lines and exosomes of prostate cancer with different metastatic potential was found. Within this chemokines they were found not previously described in prostate cancer, which have shown to participate in processes of tumor immunology and metastases in other types of solid tumors. On the other hand patients with benign prostatic hyperplasia showed a moderate inflammatory profile dominated by chemokines CCL5 and CCL22

Key words: Chemokines, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP) son las enfermedades más comunes de la glándula prostática, las cuales representan una carga significativa para el paciente y para los sistemas de cuidado en salud de muchos países del mundo. Ambas son enfermedades crónicas con una larga evolución, caracterizados por lesiones precursoras y de lenta progresión (1).

Mientras la patogénesis de ambas enfermedades no es del todo bien comprendida, se cree que ambas son de etiología multifactorial, siendo los principales factores de riesgo la inflamación crónica, disrupción metabólica, influencias hormonales y variantes genéticas. A pesar de esas características comunes, la HPB y el CaP exhiben importantes diferencias histológicas.

La HPB es definida como un agrandamiento benigno de la glándula prostática (2). Aunque la manifestación clínica de la enfermedad consiste en un perfil de síntomas caracterizado como síntomas del tracto urinario bajo (*lower urinary tract symptoms, LUTS*), la enfermedad incluye una proliferación benigna tanto de los compartimientos epiteliales como estromales.(2). La prevalencia se incrementa desde un 25% en hombres entre los 40 a 49 años de edad, a más del 80% en hombres entre 70 a 79 años de edad (3). Estudios recientes han asociado alteraciones complejas implicadas en procesos inflamatorios crónicos y de reparación de heridas con la etiología de la enfermedad (4).

Por su parte, con 13 millones de casos nuevos alrededor del mundo cada año, el CaP es un serio problema de salud pública. Este cáncer es común en hombres mayores de 50 años y es la sexta causa de muerte relacionada con cáncer en hombres de todo el mundo. Así como otros cánceres, el de próstata es multifactorial, con factores de riesgo no modificables como la herencia, la etnicidad y la localización geográfica, pero con factores de riesgo modificables como la dieta (5). Aunque los estudios moleculares, experimentales, y datos clínicos sugieren que la inflamación puede contribuir o promover la carcinogénesis de la próstata, el enlace etiológico no ha sido establecido plenamente (6).

A. HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA Y CANCER DE PROSTATA

La hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP) son dos condiciones clínicas consideradas enfermedades crónicas con aparición temprana y de progresión lenta (7). La HPB es una de las enfermedades proliferativas más frecuente que afectan a varones de edad madura y avanzada(8, 9), mientras que el CaP es uno de los canceres más comunes en varones adultos y representa una causa de muerte por cáncer en hombres alrededor del mundo (10, 11).

La HPB y el CaP no poseen unas relaciones genéticas y moleculares claras lo que por tanto se considera que ambas condiciones presentan vías patogénicas diferentes (12). Durante el desarrollo de CaP e HPB, ocurren interacciones entre el epitelio y el estroma, los cuales resultan en la formación de un estroma reactivo (13, 14). Las dos enfermedades se originan en diferentes áreas de la próstata: la HPB se forma en la zona transicional y en la zona central de la glándula, mientras que el CaP proviene de la zona periférica. La HPB es una enfermedad afecta a más del 50% de hombres de 60 años de edad, y es causa de millones de dólares en gastos de cuidado de la salud para el tratamiento de síntomas del tracto urinario inferior y la obstrucción urinaria (15). .

La inflamación crónica causa hipoxia local, lo que conduce a la liberación de ROS y óxido nítrico (NO). El estrés oxidativo dispara los niveles de ácido araquidónico, que por medio de las ciclo-oxigenasas son convertidas a prostaglandinas, los cuales juegan un papel importante en la regulación de la proliferación celular (16). Adicionalmente, la hipoxia dispara la liberación de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que estimula la neovascularización y la diferenciación de fibroblastos, los cuales son factores promotores de la HPB o del CaP (7).

El CaP es el cáncer no cutáneo más frecuente en varones en Estados Unidos y es el segundo cáncer más frecuente después del cáncer de pulmón en hombres alrededor del mundo. En términos de mortalidad, este cáncer ocupa el segundo lugar en los Estados Unidos y es la sexta causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Cada año mueren aproximadamente 30,000 hombres en los Estados Unidos y más de 250,000 hombres alrededor del mundo(17, 18). Datos recientes de supervivencia relativos en los Estados Unidos indican que aproximadamente 1 en 11 (9%) pacientes con CaP fallecerán de la enfermedad en un periodo de 15 años después del diagnóstico (19). Hay tres factores de

riesgo no modificables para el cáncer de próstata: edad, raza, y la historia familiar. Además, existen factores modificables o de comportamiento que han sido asociados con el riesgo de padecer de este cáncer. Aunque no haya sido establecido firmemente, factores como la actividad física y el consumo frecuente de tomates y otros vegetales han sido establecidos como protectores. Por el contrario, la ingesta de productos lácteos y carnes rojas puede incrementar el riesgo a contraer este cáncer(20).

Más allá del papel permisivo de las hormonas sexuales, la fisiopatología de HPB y de CaP permanecen básicamente desconocidos. Aunque la edad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de ambas condiciones, varios factores juegan un papel importante (ej., mediadores inflamatorios, hormonas, factores dietarios, genes inflamatorios, y estrés oxidativo), por lo tanto no existe un consenso de la causa primaria.

B. QUIMIOCINAS, INFLAMACION, Y ASOCIACION CON HPB Y CaP

La familia de quimiocinas está compuesta de 50 proteínas de bajo peso molecular, cuya principal función es la regulación del tráfico de leucocitos en condiciones fisiológicas y patológicas. Todas las quimiocinas se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que son expresadas predominantemente por leucocitos. Una de las principales características del “mundo de las quimiocinas” es que la mayoría de ellas se unen a más de un receptor, y en paralelo, muchos receptores tienen alta afinidad por varios ligandos (21-25). Las quimiocinas y sus receptores son esenciales para la integridad de la respuesta inmune del huésped. **(Figura 1)**. Las quimiocinas se dividen en sub-grupos de acuerdo a criterios estructurales y funcionales. Estructuralmente, la categorización está basada en el número y localización de residuos de cisteína en el extremo N de las moléculas, dividiendo a las quimiocinas en cuatro principales sub-grupos: CXC, CC, CX3, y C, en donde las más numerosas son las de los sub-grupos CXC y CC. Años después de una terminología confusa, un nuevo sistema de nomenclatura fue establecido por *Zlotnik y Yoshie*.(26), la cual está basada en una clasificación estructural. En paralelo, funcionalmente, las quimiocinas son divididas en dos grupos, homeostáticas e inflamatorias.

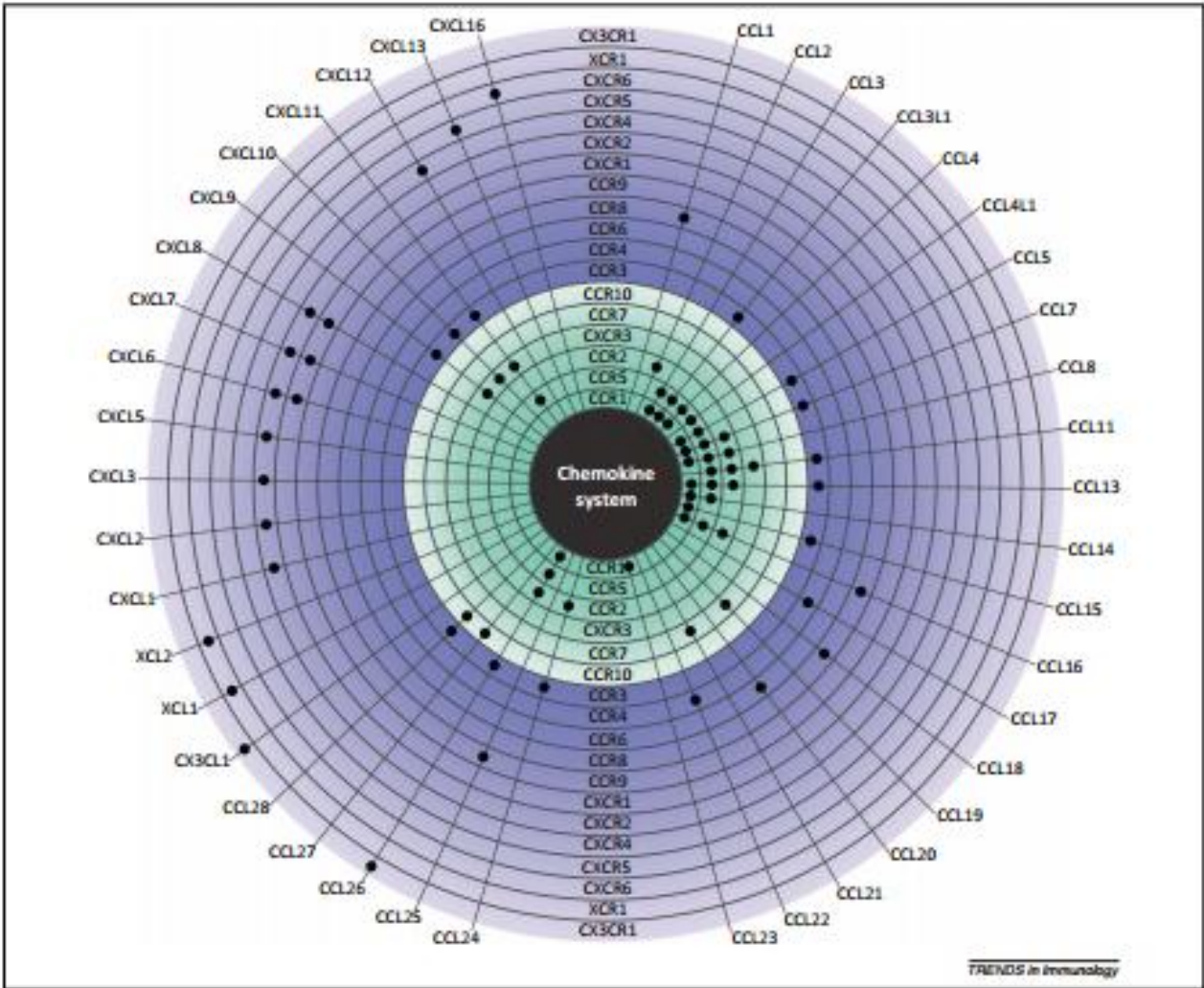


FIGURA 1. QUIMIOCINAS: LIGANDOS Y RECEPTORES.

Tomado de: Annelien J.M. Zweemer, Jimita Toraskar, Laura H. Heitman, and Adriaan P. IJzerman. *Trends in Immunology*, June 2014, Vol 35, No 6.

Estudios indican que una variedad de quimiocinas son secretadas por el microambiente prostático como consecuencia de interrupciones en la homeostasis del tejido normal debido al proceso de envejecimiento o a la respuesta inflamatoria. La acumulación de fibroblastos estromales senescentes, y, posiblemente, células epiteliales, pueden servir como fuerzas potenciales que conducen a la secreción de quimiocinas en el envejecimiento y en el agrandamiento de la próstata. Las quimiocinas pueden estimular poderosas vías de

transducción de señales pro-proliferativas y así funcionar como potentes factores de crecimiento en el desarrollo y progresión de la HPB (27).

C. MICROAMBIENTE INFLAMATORIO DE LA PROSTATA

Numerosas observaciones sugieren que el microambiente inflamatorio puede estar asociado con la iniciación de la tumorigénesis de la próstata. Las células epiteliales de la próstata que han sufrido atrofia focal inflamatoria pueden producir mediadores que generan un microambiente inflamatorio lo que permite a las células sufrir una transformación neoplásica (7, 28). El microambiente inflamatorio pudiera influir en estados tempranos del CaP. La presencia de células inflamatorias crónicas (y sus mediadores) puede indicar la inducción a metástasis y progresión al fenotipo resistente a castración. Las evidencias muestran que cada una de las células linfoides y mieloides se encuentran involucradas en la carcinogénesis de la próstata y/o en la invasión del tumor y en la metástasis (**Figura 2**).

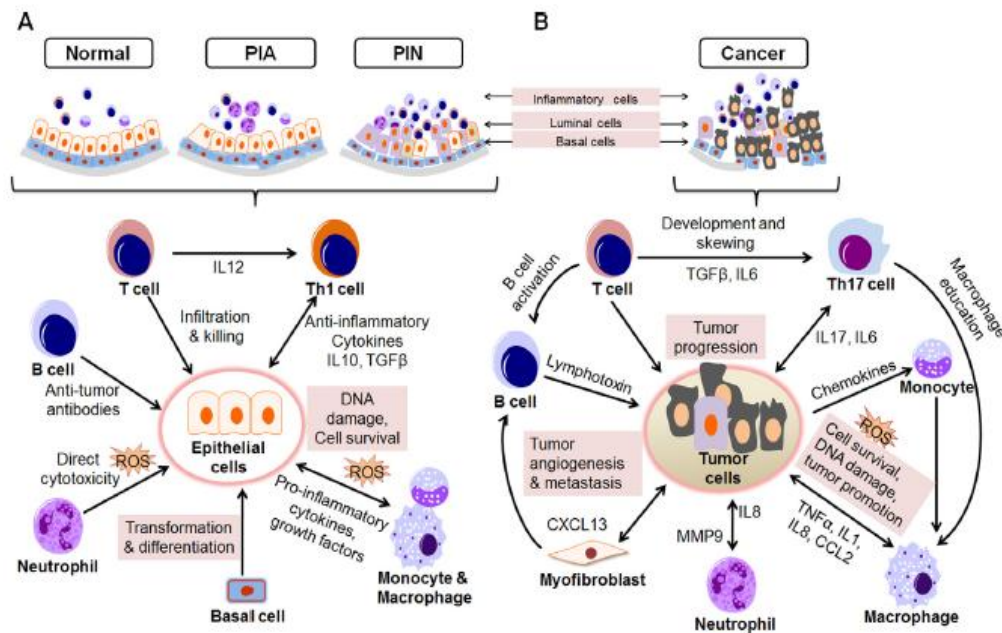


FIGURA 2. CÉLULAS INFLAMATORIAS INVOLUCRADAS EN PROGRESIÓN DE CÁNCER DE PRÓSTATA.

Tomado de: Dinesh Thapa, Rita Ghosh. *Biochemical Pharmacology* 94(2015) 53-62.

Los mediadores inflamatorios, tales como las citoquinas y quimiocinas son moléculas críticas en vías de señalización que conducen a la comunicación entre células epiteliales malignas y el microambiente circundante contribuyendo así a las múltiples marcas del cáncer. Su regulación está mediada por factores de transcripción específicos. La activación de la señalización amplifica la expresión de mediadores inflamatorios seguidas de acumulación de células del sistema inmune, los cuales en conjunto inducen la inflamación asociada a tumores y la desregulación de la homeostasis

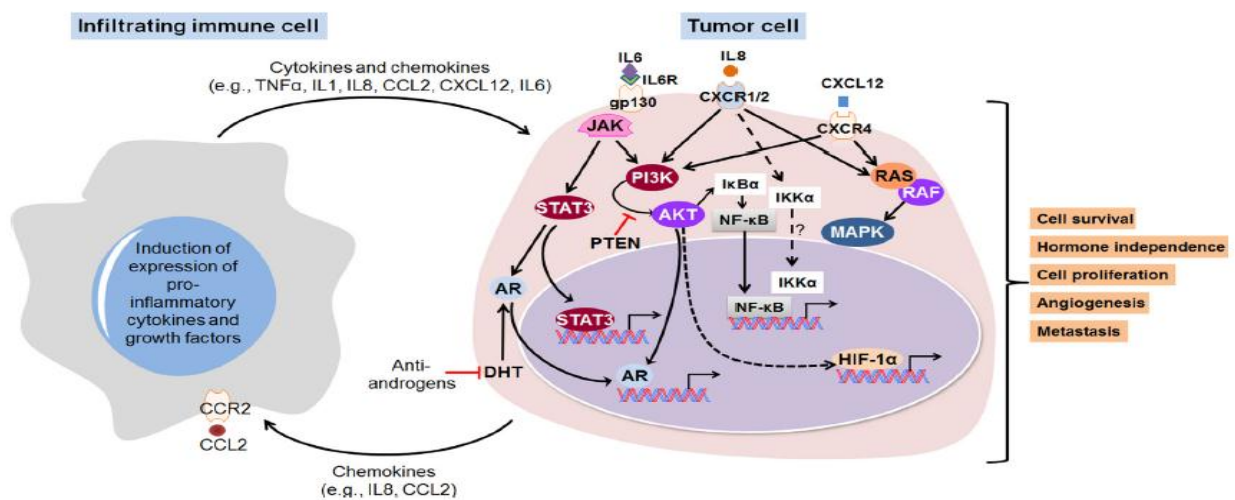


FIGURA 3. MEDIADORES PRO-INFLAMATORIOS INDUCEN MÚLTIPLES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN EL MICROAMBIENTE DE LA PRÓSTATA.

Tomado de: Dinesh Thapa, Rita Ghosh. *Biochemical Pharmacology* 94(2015) 53-62.

D. METASTASIS DEL CANCER DE PROSTATA, QUIMIOCINAS Y EXOSOMAS

La principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer es el desarrollo de metástasis, siendo éste el proceso que le permite a la célula cancerígena diseminarse en el cuerpo, estableciendo nuevas colonias en órganos distantes al sitio de origen(29) . Ciertos tumores sólidos presentan patrones de diseminación preferencial a algunos órganos, dicho patrón ha sido llamado metástasis órgano-específica, dentro de estos, destacan: el cáncer de mama, el de próstata, colorectal, y de pulmón(30). En el caso particular del CaP, el principal sitio de metástasis es el sistema óseo. El desarrollo de lesiones metastásicas en este sitio altera la homeostasis del hueso conllevando en este caso a la formación de lesiones

osteoblásticas(30). Para hacer más complejo el panorama de la metástasis, recientemente se ha involucrado a un tipo particular de vesículas membranosas conocidas como “exosomas”, las cuales tienen diámetros entre 40-100 nm, y hacen parte del sistema endosomal (31). Gracias a su pequeño tamaño, los exosomas evaden el aclaramiento impuesto por el sistema fagocítico mononuclear a partículas mayores a 100 nm, con lo que maximizan su tiempo de circulación lo que favorece su función en la comunicación intercelular a nivel sistémico(32).

Además de poseer proteínas comunes a los exosomas en general, aquellos derivados de tumores también expresan diversos antígenos tumorales que reflejan las células tumorales originarias. Aunque la liberación de exosomas puede ser demostrada en muchos tipos celulares en proliferación, se ha encontrado que su liberación es mayor en las células tumorales, lo que se evidencia por su elevada proporción en el plasma, líquido ascítico, y efusiones pleurales de pacientes con cáncer (33, 34). Estas características han llevado a diversos investigadores a proponer a los exosomas como potenciales biomarcadores diagnósticos o pronósticos e incluso las vías de la biogénesis de exosomas se han señalado como posibles fuentes de blancos terapéuticos(35).

De los exosomas se considera que juegan un papel importante en la comunicación intercelular afectando a las células blanco ya sea mediante su estimulación directa a través de ligandos de superficie o por transferencia de moléculas, ya sea proteínas o RNAs, contenidas en los exosomas. Resulta de gran interés el hallazgo reciente de algunos receptores de quimiocinas en la membrana de exosomas y que algunas quimiocinas y citoquinas, además de ser secretadas directamente al espacio extracelular, también pueden ser liberadas de forma alternativa por las células, incluyendo células tumorales, a través de exosomas (36-43). Sin embargo, los mecanismos responsables de la exocitosis de quimiocinas/citoquinas mediadas por exosomas así como el papel de las quimiocinas y receptores de quimiocinas presentes en los mismos no han sido aún elucidados. La investigación reciente en exosomas apunta a que estas estructuras conllevan un gran potencial para ser usadas en la identificación de pacientes con probabilidades de desarrollar metástasis, a la vez que el proceso de biogénesis de exosomas pudiera proporcionar nuevos blancos para terapia anti-metastásicas (44, 45).

METODOLOGÍA

A. DISEÑO METODOLÓGICO

Se realizó un estudio observacional en el cual se determinaron, mediante ensayos ELISA múltiples e individuales, los perfiles de expresión de un panel de quimiocinas proinflamatorias, en el sobrenadante y en los exosomas de células humanas de epitelio prostático, canceroso y no tumorigénico, mantenidos en condiciones estándares de cultivo *in vitro*. Adicionalmente, se analizaron los niveles de las mismas quimiocinas proinflamatorias, en mezclas (“pool”) de muestras de suero de pacientes diagnosticados con HPB o con CaP.

B. LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron las líneas celulares LNCaP, PC-3 y PWR-1E, las cuales se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA). La línea LNCaP fue derivada de un ganglio linfático en un paciente con CaP hormono-dependiente, quien presentaba metástasis a ganglios linfáticos(46), por lo cual representa un modelo de metástasis a ganglio, con baja agresividad (47). La línea PC-3 fue aislada de una lesión metastásica en vertebra de un paciente con CaP hormono-independiente(48), y representa un modelo de metástasis ósea de alta agresividad (49-52). LNCaP y PC-3 representan modelos *in vitro* de CaP humano ampliamente usadas, tienen características establecidas similares al CaP clínico, y derivan de diferentes sitios metastásicos, por lo que permiten estudiar los mecanismos de progresión y metástasis del CaP. La línea celular PWR-1E se usó como referencia, ya que es una línea celular inmortalizada, no tumorigénica, que presenta características de células epiteliales normales de próstata, incluyendo la expresión del receptor de andrógeno y la inducción de la expresión de PSA en respuesta a andrógenos (53). LNCaP y PC-3 fueron mantenidas en medio RPMI-1640, suplementado con 1% de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS), mientras que PWR-1E se mantuvo en medio de cultivo para queratinocitos libre de suero. Todos los cultivos fueron mantenidos en un ambiente humidificado a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

C. ESPECÍMENES CLÍNICOS

Se prepararon mezclas de sueros de pacientes para evaluar los niveles de expresión de quimiocinas proinflamatorias. Una mezcla se preparó a partir de cantidades equivalentes de suero de pacientes con HPB (n=9) y la otra con cantidades equivalentes de sueros de pacientes con CaP (n=9). Estas muestras se obtuvieron de pacientes que participaron del proyecto **“Evaluación de genes candidatos a biomarcadores de metástasis del cáncer de próstata”** ejecutado por parte del grupo de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Cartagena. Dichas muestras se mantuvieron almacenadas a -80°C hasta su utilización en los ensayos de cuantificación por ELISA múltiple. Se analizaron sueros de pacientes que fueron diagnosticados con cáncer de próstata o hiperplasia prostática benigna, de quienes se contó con información referente a diagnóstico histológico, datos epidemiológicos y clínicos.

D. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS LIBERADOS DE CÉLULAS EN CULTIVO

Las líneas celulares LNCaP y PC-3 se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con 1% de L-glutamina y 10% FBS, hasta alcanzar el 70% de confluencia. En este momento se cambió el medio por RPMI-1640 libre de FBS por 12 horas. La línea celular PWR-1E se cultivó en medio de queratinocitos libre de FBS hasta alcanzar el 70% de confluencia. Se recolectó el sobrenadante de los cultivos celulares y se centrifugó a 2000 × g por 30 minutos para eliminar restos celulares y desechos, y se transfirió a un nuevo tubo para el aislamiento de exosomas utilizando el estuche **Total Exosome Isolation kit from culture medium** (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los exosomas recuperados fueron almacenados a -20°C hasta su uso en los ensayos de cuantificación por ELISA múltiple.

E. ENSAYO ELISA MULTIPLE DE QUIMIOCINAS PROINFLAMATORIAS

La determinación de los niveles de quimiocinas inflamatorias se evaluó por el ensayo enzimático inmunoabsorbente ELISA múltiple (Multi-Analyte ELISArray, QIAGEN) según las indicaciones del fabricante. El estuche Multi-Analyte ELISArray analiza un panel de 12 quimiocinas bajo condiciones uniformes. Las quimiocinas incluidas en este ensayo fueron IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-1a/CCL3, MIP-1b/CCL4, IP-10/CXCL10, I-

TAC/CXCL11, MIG/CXCL9, Eotaxin-1/CCL11, TARC/CCL17, MDC/CCL22, y GROa/CXCL1. Los controles positivos y negativos también son incluidos en el estuche. Los resultados son expresados como picogramos por mililitros. El estuche completo ofrece la mejor combinación posible de anticuerpos de captura y de detección para cada proteína en el panel y todos los reactivos necesarios para la detección colorimétrica. Los niveles de quimiocinas se midieron en un lector de microplatos (MultiSkan microplate reader, Thermo), a una absorbancia a 450 nm.

Para la cuantificación múltiple de las quimiocinas, 50 μ l de muestra (solución de exosomas, sobrenadante de cultivo celular, o mezcla de suero, según correspondiera) fueron depositados por triplicado en placas de ELISA de 96 pozos cubiertos con anticuerpo monoclonal específico para la quimiocina a evaluar, incubados por 2 hrs a 18-25°C y lavados tres veces; seguidamente a cada pozo se le agregó 50 μ l de anticuerpo marcado con biotina y 100ul de conjugado de estreptavidina-HRP a una dilución apropiada y se incubó por 30 minutos a 18-25°C. Después de tres lavados, se agregó 100 μ l de substrato a cada pozo y se incubó por 20 minutos a 18-25°C. Finalmente se agregaron 50 μ l de solución de parada y la intensidad del color se determinó a 450 nm usando lector de ELISA. En cada ensayo se incluyeron los estándares y controles apropiados para la cuantificación.

Cuantificación múltiple de quimiocinas proinflamatorias en sobrenadantes de células en cultivo:

Los sobrenadantes fueron recolectados de las células cultivadas en medio libre de suero por 12 horas. Estos sobrenadantes fueron clarificados por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min y los niveles de quimiocinas fueron determinados mediante ensayo ELISA múltiple cuantitativo usando el estuche "*human chemokine Multi-Analyte ELISArray Kit*" (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron en triplicados.

- **Cuantificación múltiple de quimiocinas proinflamatorias en exosomas aislados de sobrenadantes de células en cultivo:** Aislamiento de proteínas a partir de exosomas.

Las proteínas contenidas en los exosomas aislados de los sobrenadantes de células en cultivo se extrajeron con el Total Exosome Protein Isolation Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas aisladas de los exosomas se utilizaron en ensayos de ELISA múltiple para cuantificar los niveles de las quimiocinas proinflamatorias usando el estuche “*human chemokine Multi-Analyte ELISArray Kit*” (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron en triplicados. Cada muestra se ajustó para un contenido de proteínas de 1ug/ml con buffer PBS.

- **Cuantificación múltiple de quimiocinas proinflamatorias en mezclas de sueros de pacientes diagnosticados con CaP o HPB:**

Las mezclas de suero de pacientes se utilizaron en ensayos de ELISA múltiple para cuantificar los niveles de las quimiocinas proinflamatorias usando el estuche “*human chemokine Multi-Analyte ELISArray Kit*” (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron en triplicados. Se utilizó 50 µl de cada mezcla de sueros proveniente del grupo de pacientes con HPB (n=9) y del grupo de pacientes con CaP (n=9), respectivamente, en triplicados.

F. ENSAYO ELISA INDIVIDUAL DE QUIMIOCINAS PROINFLAMATORIAS EN SOBRENADANTE DE LINEAS CELULARES EN CULTIVO

Se analizaron los niveles individuales de las quimiocinas proinflamatorias CXCL-8 (IL-8) y CXCL1 (Gro α) en los sobrenadantes de las líneas celulares cultivadas. Estos sobrenadantes fueron clarificados por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min y los niveles de quimiocinas fueron determinados mediante ensayo ELISA individual cuantitativo usando los estuches *IL8 Single Analyte ELISA Kit* y *GRO α Single Analyte ELISArray Kit*, respectivamente (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron en triplicados.

G. ANALISIS ESTADISTICO

La cuantificación por ELISA de los niveles de quimiocinas en cada muestra se determinó por extrapolación de las medias de los valores de absorbancia a partir de la curva obtenida de los estándares incluidos en los estuches comerciales. Para determinar las diferencias en

niveles de quimiocinas entre los diferentes grupos, se utilizará la prueba de ANOVA cuando se comparen más de dos grupos y la prueba t de student cuando se comparen dos muestras o grupos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, USA). La t de student fue usada para comparar los promedios de los dos grupos. Análisis de ANOVA de dos vías se desarrolló para evaluar la significancia cuando dos o más grupos están involucrados. Los valores fueron considerados significativos si $p < 0.05$.

I. RESULTADOS.

A. PERFIL DE EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS PROINFLAMATORIAS EN LAS LINEAS CELULARES DE PROSTATA

Los perfiles de expresión determinados mediante el panel comercial Multi-Analyte ELISArray para las líneas celulares en cultivo, se observan en la **Figura 4** (a nivel de sobrenadantes) y en la **Figura 5** (a nivel de exosomas aislados de sobrenadantes). El análisis de los niveles de las 12 quimiocinas proinflamatorias muestra que la línea celular PC3 tuvo altos niveles de expresión de las quimiocinas CXCL1 y CXCL8, tanto en el sobrenadante como en los exosomas, mientras que las quimiocinas CCL2 y CXCL10 tuvieron un nivel de expresión moderado. Por su parte, la línea celular LNCaP mostró un bajo nivel de quimiocinas proinflamatorias en sobrenadante y exosomas, en los que CXCL10, CXCL8, y CXCL9 tuvieron los niveles más altos. En contraste, la línea celular no tumorigénica PWR-1E mostró un bajo perfil proinflamatorio, en los que los niveles más altos fueron presentados por CXCL8 y CXCL10, tanto en exosomas como en sobrenadante.

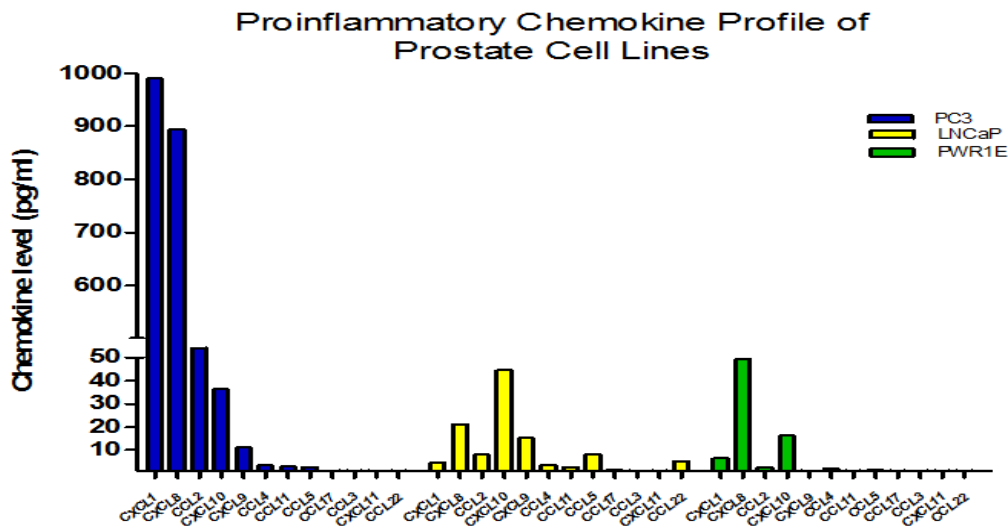


Figura 4. Perfil de quimiocinas proinflamatorias en sobrenadante de líneas celulares de cáncer de próstata.

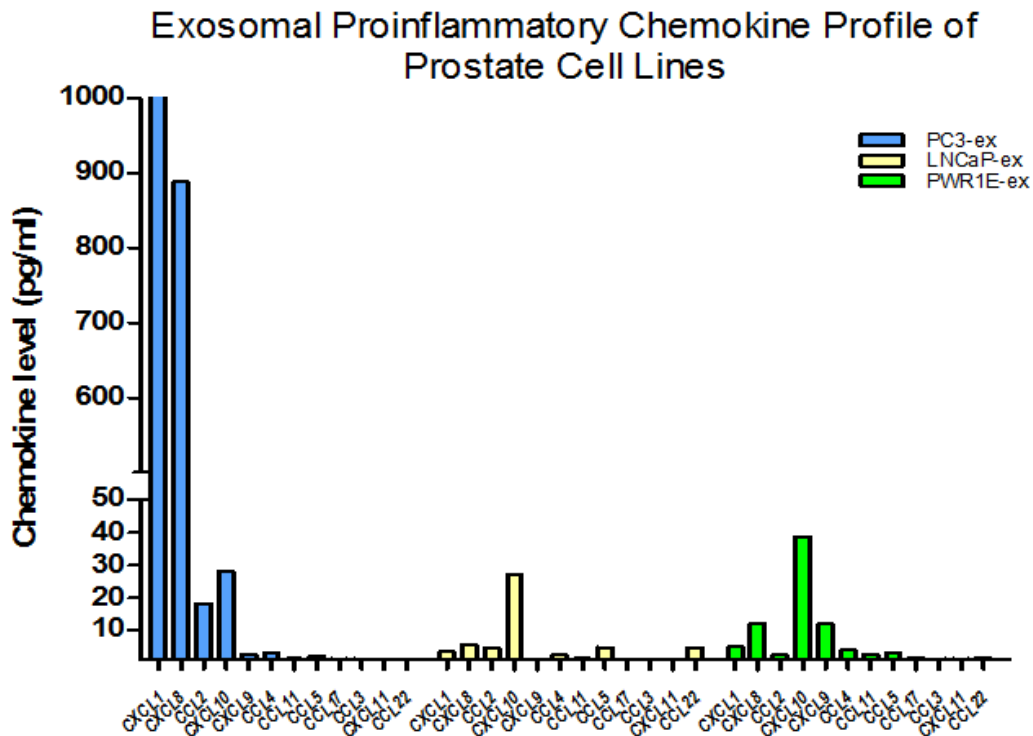


Figura 5. perfil de quimiocinas inflamatorias en exosomas de líneas celulares de cáncer de próstata.

B. NIVELES DE EXPRESION DE LAS QUIMIOCINAS PROINFLAMATORIAS CXCL1 (GRO α) Y CXCL8 (IL-8) EN LINEAS CELULARES DE PROSTATA.

Para validar los datos obtenidos con el ensayo ELISA múltiple, se realizó la cuantificación de la expresión individual de CXCL1 y CXCL8 usando estuches de ELISA individuales para estas dos quimiocinas (Single Analyte ELISA Array Kit, Qiagen). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada línea celular: PC-3, LNCaP y PWR-1E (línea de referencia).

La **Figura 6** muestra los niveles de la quimiocina CXCL1 (Gro α) y la **Figura 7** muestra los niveles de la quimiocina CXCL8 (IL-8) en los sobrenadantes de las líneas celulares de próstata estudiadas. Se puede observar que los niveles, tanto de CXCL1 como de CXCL8 fueron altamente significativos en PC3, comparado con los niveles en LNCaP y PWR-1E. No hubo diferencias significativas en los niveles de CXCL1 y CXCL8 en la línea LNCaP comparado con la línea no tumorigénica PWR-1E, lo que pudiera estar indicando que estas

quimiocinas proinflamatorias, CXCL1 y CXCL8, se encuentran asociadas al fenotipo altamente agresivo de las células PC-3.

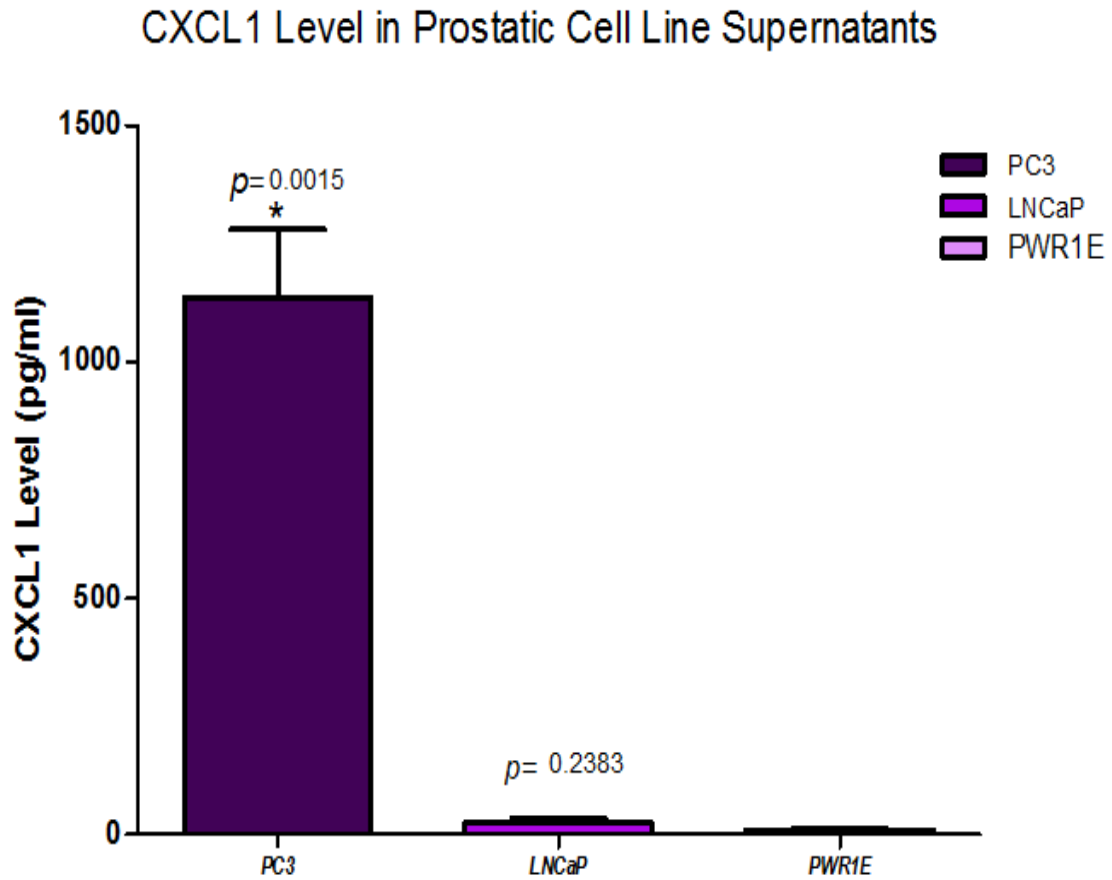


Figura 6. Niveles de cxcl1 en el sobrenadante de líneas celulares de próstata.

IL-8 Level in Prostatic Cell Line Supernatants

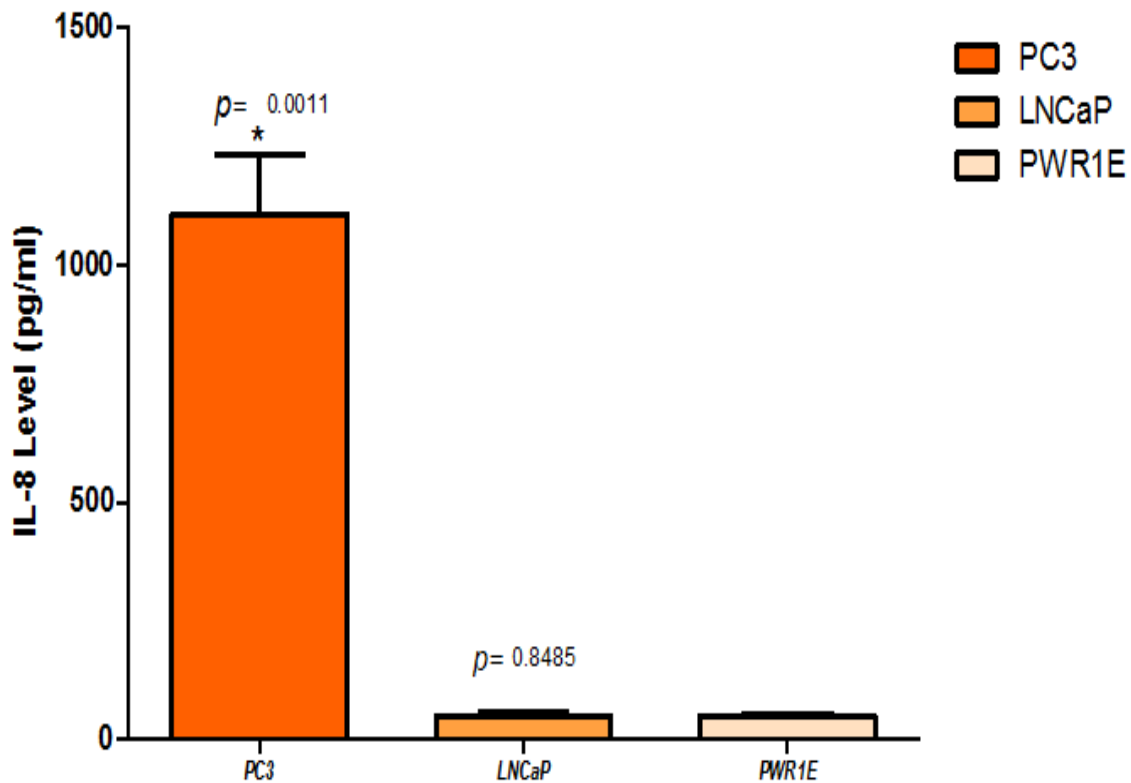


Figura 7. Niveles de *cxcl8* en el sobrenadante de líneas celulares de próstata.

C. PERFIL DE EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS PROINFLAMATORIAS EN MEZCLAS DE SUEROS DE PACIENTES

El estuche de ELISA múltiple utilizado para analizar los niveles de 12 quimiocinas proinflamatorias (Multi-Analyte ELISArray, QIAGEN) fue usado para evaluar los niveles de expresión en una mezcla preparada a partir de cantidades equivalentes de 9 sueros de pacientes diagnosticados con HPB o con CaP. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada mezcla de suero (HPB o CaP).

Se encontró que las muestras provenientes de los pacientes con CaP tuvieron un perfil con niveles elevados de quimiocinas proinflamatorias dominadas por CCL3, CXCL1, CCL5, CCL4, CXCL8, y CCL2, como lo indica la **Figura 8**. En contraste, las muestras provenientes

de los pacientes con HPB tuvieron un perfil con niveles moderados de quimiocinas proinflamatorias, dominadas por CCL5 y CCL22, como lo indica la **Figura 9**.

La **Figura 10** muestra la comparación de los perfiles de expresión séricos de quimiocinas proinflamatorias en pacientes con HPB y pacientes con CaP. Se puede apreciar que los pacientes con CaP tuvieron un perfil de expresión de quimiocinas proinflamatorias significativamente diferente al perfil de los pacientes con HPB.

Por otra parte, la **Figura 11** muestra la comparación de los perfiles de expresión de quimiocinas proinflamatorias en el suero de pacientes con CaP y la línea celular con fenotipo altamente metastásico PC-3. Se puede apreciar que los niveles de las quimiocinas CXCL1 y CXCL8 estuvieron elevados, a niveles comparables, tanto en los pacientes de CaP como en el sobrenadante de las líneas celulares. Sin embargo, los niveles de las quimiocinas CCL3, CCL5, CCL4, CCL2. y CCL22 se encontraron muy elevados en el suero de los pacientes con CaP pero no fueron detectables en el sobrenadante de la línea PC-3. Esto pudiera indicar que los niveles de estas quimiocinas en los pacientes de CaP provienen de células diferentes al epitelio tumoral de la próstata.

Una comparación similar, realizada entre los perfiles séricos de pacientes con HPB y el sobrenadante de la línea celular PC-3 se muestra en la **Figura 12**. Se puede apreciar que los niveles de las quimiocinas CXCL1 y CXCL8 estuvieron muy elevados en el sobrenadante de la línea celular PC-3, en comparación con el suero de los pacientes con HPB, en los cuales estas dos quimiocinas se encontraron a niveles comparativamente mucho más bajos. En contraste, los pacientes con HPB mostraron niveles elevados de las quimiocinas CCL5 y CCL22, y niveles moderados de las quimiocinas CCL17, CCL10, CCL2, CCL11, CCL4, CCL9, CCL3 y CXCL11, los cuales fueron prácticamente indetectables en el sobrenadante de las células PC-3 metastásicas.

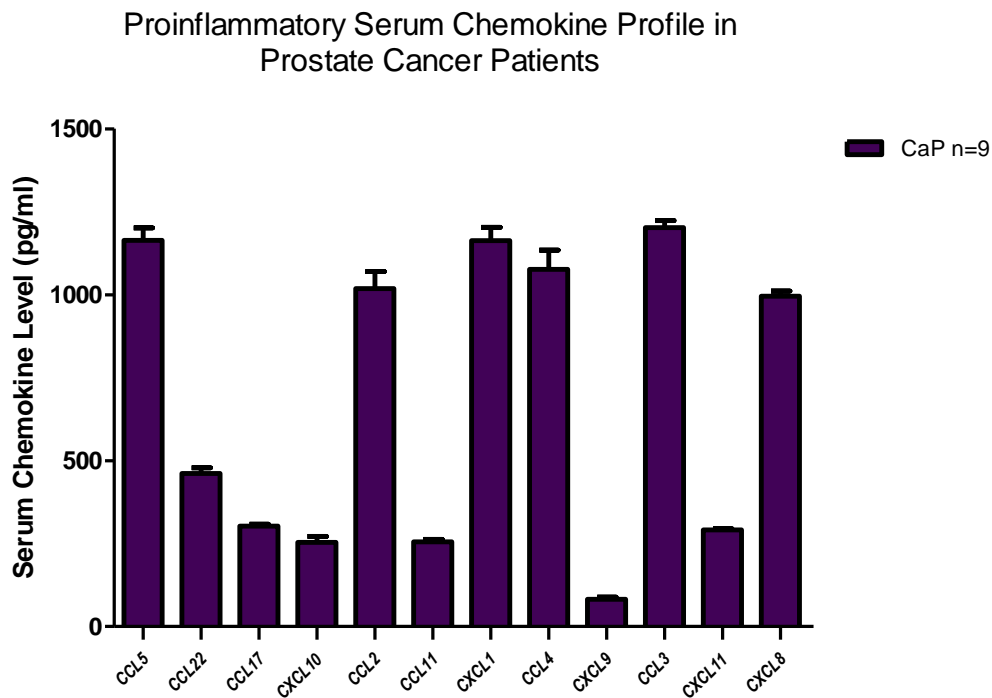


Figura 8. Perfil sérico de quimiocinas proinflamatorias en pacientes con cáncer de próstata.

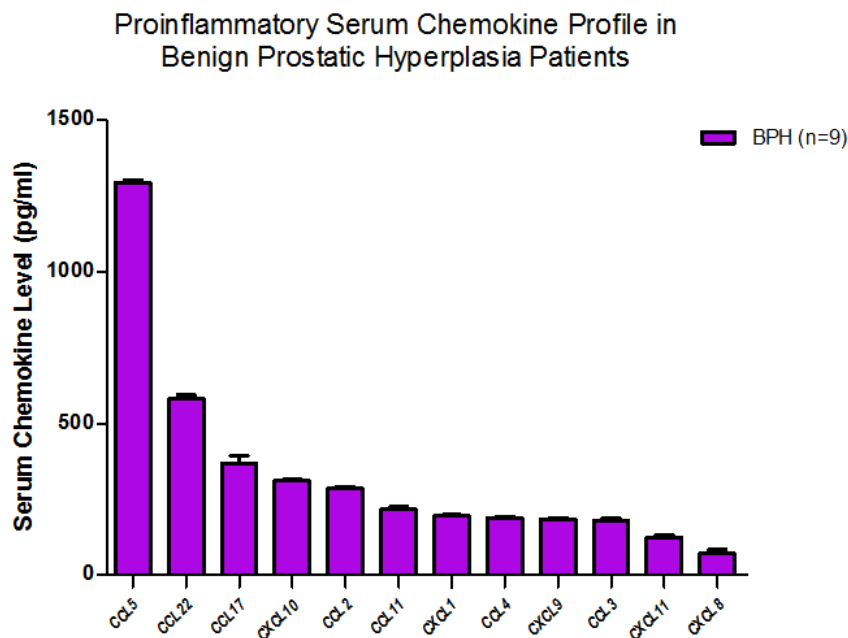


Figura 9. Perfil sérico de quimiocinas proinflamatorias en pacientes con hiperplasia prostática benigna.

Proinflammatory Serum Chemokine Profiles of PCa and BPH Patients

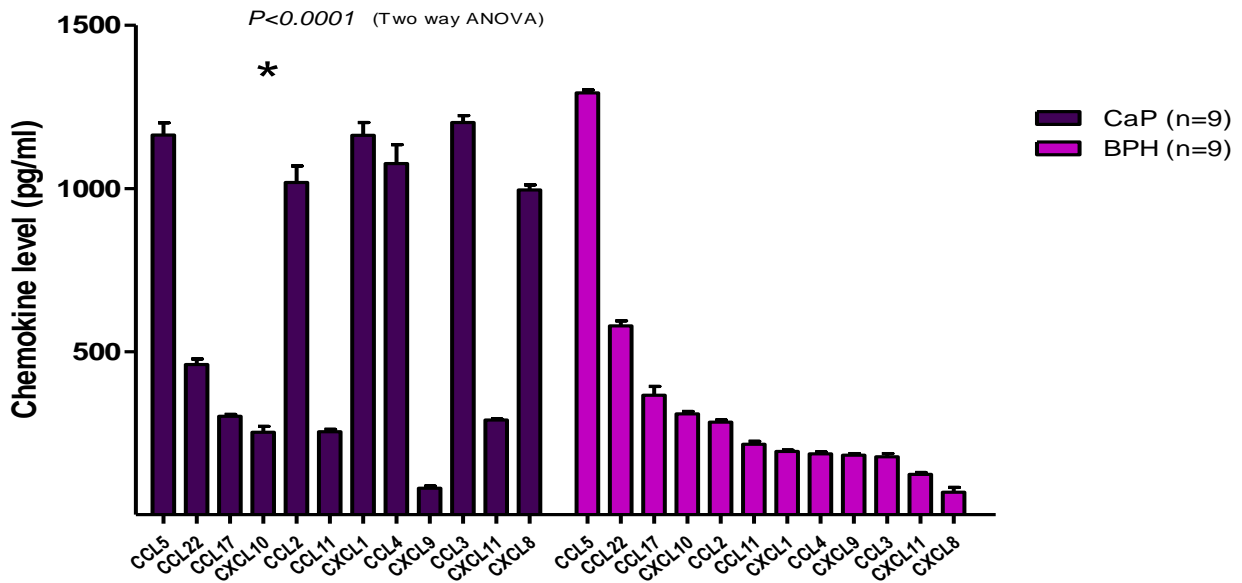


Figura 10. Comparación de los perfiles séricos de quimiocinas proinflamatorias de pacientes con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.

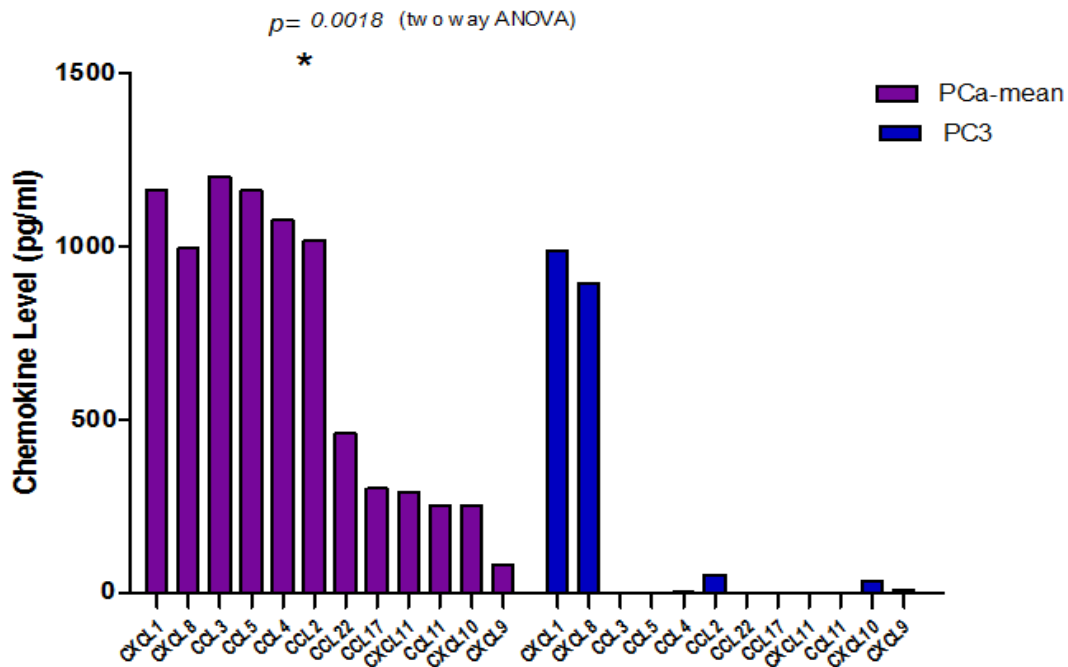


Figura 11. Comparación de los perfiles de quimiocinas proinflamatorias en suero de pacientes con cáncer de próstata y en sobrenadante de células pc-3 altamente metastásicas.

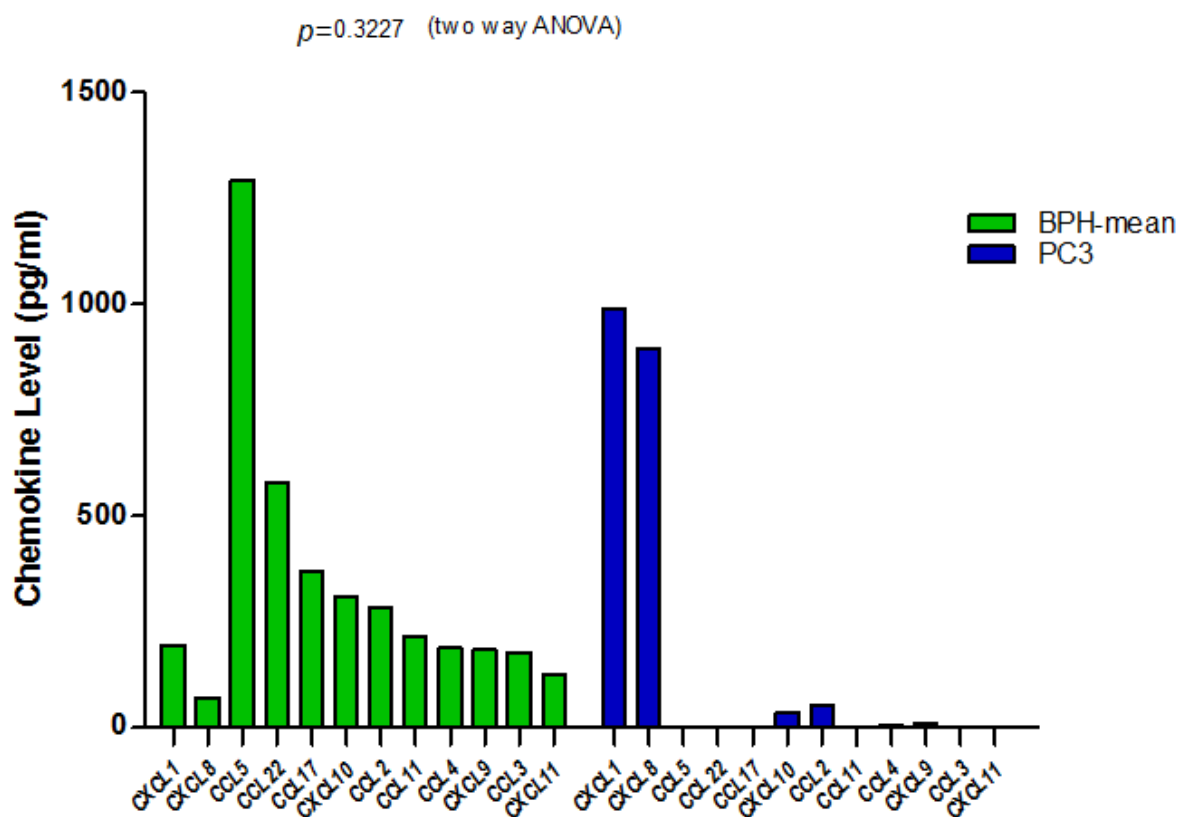


Figura 12. Comparación de los perfiles de quimiocinas proinflamatorias en suero de pacientes con hiperplasia prostática benigna y en sobrenadante de células PC-3 altamente metastásicas.

II. DISCUSIÓN

A pesar del progreso en el diagnóstico y tratamiento, la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP) siguen siendo las dos patologías prostáticas de mayor prevalencia en el adulto mayor. Aunque los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades son complejos, y sus patogénesis no son bien comprendidas, se ha reportado que ambas son de etiología multifactorial, con incidencia y prevalencia influenciadas por la edad y el balance de hormonas, además, han sido asociadas con inflamación prostática crónica (54).

La inflamación crónica puede causar liberación de quimiocinas por parte del infiltrado inflamatorio y por el tejido prostático injuriado. Las células activadas del sistema inmune son la principal fuente de mediadores inflamatorios responsables de niveles elevados de citoquinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno que contribuyen al daño del DNA, a la proliferación celular y a la invasividad de las células tumorales (55, 56). Estos hallazgos destacan la necesidad de una mejor comprensión del microambiente de la próstata, incluyendo la participación de las células inflamatorias en la inducción de cambios moleculares asociados con el desarrollo y progresión del cáncer de próstata.

Los tumores tienen diferentes mecanismos de comunicación intercelular que ayudan al crecimiento, progresión y diseminación. Los exosomas liberados por esos tumores pueden actuar produciendo un ambiente fértil para soportar el crecimiento primario de lesiones neoplásicas a sitios potenciales de metástasis (57).

Sin embargo, hasta el momento no se han reportado otros estudios que hayan evaluado el perfil de quimiocinas proinflamatorias en exosomas de líneas celulares de cáncer de próstata con diferentes fenotipos metastásico. Por lo tanto, en el presente estudio, se determinaron los perfiles de expresión de quimiocinas proinflamatorias en sobrenadantes y exosomas liberados por las células de cáncer de próstata en cultivo, con el objetivo de determinar si existen diferencias de expresión a nivel proteico y si estas diferencias se encuentran asociadas con el fenotipo metastásico.

Además, se compararon estos perfiles de expresión en suero de pacientes con hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata. Los resultados de cuantificación de quimiocinas utilizando un estuche de ELISA múltiple, mostraron niveles altos de expresión de las quimiocinas CXCL1 y CXCL8 en la línea celular PC3, tanto en sobrenadantes como en exosomas, indicando su posible rol en las transformaciones metastásicas. La quimiocina CCL2 se encontró a niveles bajos tanto en exosomas como en sobrenadante de la línea PC3.

Para las líneas celulares LNCaP y PWR-1E se evidenció un perfil con niveles bajos de quimiocinas proinflamatorias, tanto en exosomas como en sobrenadantes. De las quimiocinas escogidas para la validación individual, se confirmó la sobreexpresión de CXCL1 y CXCL8 en la línea celular PC3 en comparación con las líneas LNCaP de bajo potencial metastásico, y PWR-1E no tumorigénica. Estas dos quimiocinas han sido previamente relacionadas con cáncer de próstata(58-65). Su presencia a altos niveles en el sobrenadante de las líneas PC-3 indicaría su implicación en las propiedades altamente metastásicas de estas células.

Además de su efecto en la migración de leucocitos, las quimiocinas muestran diversas funciones en el desarrollo de tumores a través de sus efectos en angiogénesis, hematopoyesis, metástasis y rechazo del tumor (66-69). *Moore et al* (70) demostraron que las líneas celulares de cáncer de próstata pueden producir constitutivamente quimiocinas CXC angiogénicas. El potencial tumorigénico de la línea PC3 es en parte atribuido a la producción de la quimiocina angiogénica IL8. La secreción de IL-8 por células de cáncer de próstata se encuentra asociada con la progresión(60), la independencia de andrógenos (61) y el potencial metastásico (71). Hallazgos recientes realizados por *Maxwell et al* (62) han enfatizado la importancia de secreción autocrina de IL-8 y la vía de señalización que activa en CaP, en los que la atenuación de la señalización de IL8 disminuye la viabilidad de las células de cáncer de próstata. Esto sugiere que la IL8 puede funcionar como un factor regulador significativo dentro del microambiente del tumor y que puede estar implicado en la resistencia a la deprivación de andrógenos y a la quimioterapia, aumentando la angiogénesis, e incrementando el crecimiento del tumor(61).

La quimiocina CXCL1 fue originalmente descrita por *Richmond et al* (72, 73) por su capacidad de promover el crecimiento de melanoma. Además, en melanoma la activación constitutiva de NFkB causa la expresión de CXCL1 estableciendo un circuito autocrino que aumenta el crecimiento y la metástasis del tumor (74). La CXCL1/GRO α , es una quimiocina proangiogénica tipo CXC, presente en varios tipos de cáncer, incluyendo cánceres de seno, pulmón, páncreas y próstata(75). Esta quimiocina transactiva el receptor factor de crecimiento epidérmico por corte proteolítico del factor de crecimiento parecido al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, conduciendo a la activación de la vía de señalización MAPK, que conduce a la proliferación del cáncer (76).

La quimiocina multifuncional CCL2, es un importante mediador del intercambio entre los macrófagos y las células tumorales en el microambiente de la próstata. CCL2 funciona a través de la unión a su receptor CCR2 e induce en la próstata proliferación celular, migración, e invasión, tanto en forma autocrina como paracrina (77). CCL2 facilita la angiogénesis, infiltración de macrófagos, invasión y metástasis distante (78, 79). *Izumi et al* mostraron que la expresión de CCL2 silencia al Receptor de Andrógenos (AR) incrementando y causando una migración sustancial de macrófagos y progresión del cáncer de próstata vía CCL2/CCR2 que induce la activación de STAT3(80).

El factor de transcripción NF-Kb ha sido identificado como un regulador crucial en la progresión del cáncer de próstata a un estado de independencia de andrógeno(81, 82). La activación constitutiva de NF-kB se encuentra fuertemente correlacionada con la progresión de la enfermedad, metástasis y recurrencia bioquímica(83-85). *Jin et al.* encontraron que NF-kB sobre-regula la actividad del AR, un fenómeno que es importante para la supervivencia y progresión del cáncer de próstata(82).

Como un tamizaje inicial hacia la determinación de la posible utilidad diagnóstica, se evaluó la expresión de quimiocinas proinflamatorias, mediante ELISA múltiple, en muestras clínicas de suero de pacientes con CaP y pacientes con HPB. Los resultados de ELISA múltiple mostraron la presencia de niveles séricos altos de las quimiocinas proinflamatorias CCL3, CXCL1, CCL5, CCL4, CXCL8 y CCL2 en los pacientes con cáncer de próstata, mientras que se encontraron niveles de expresión moderados de quimiocinas CCL22, CCL17, CXCL11, CCL11, y CXCL10 en estos mismos pacientes.

Por su parte, los pacientes con HPB mostraron un moderado perfil proinflamatorio dominado por las quimiocinas CCL5 y CCL22. El restante de las quimiocinas proinflamatorias mostró niveles muy bajos en suero. Al contrario de los pacientes con CaP, los pacientes con HPB tuvieron bajos niveles de quimiocinas angiogénicas CXCL8 y CXCL1.

En diversos estudios se ha mostrado que las quimiocinas CCL3, CCL4 y CCL5 inducen migración a través de su receptor CCR5 (86). La activación sucesiva de este receptor induce migración de células hacia un gradiente de quimiocinas, sin embargo estos mecanismos de regulación no se encuentran bien comprendidos. Recientemente se han realizado estudios relacionados con las vías de señalización activadas por CCR5(87).

La CXCL5 es una quimiocina proangiogénica de tipo CXC que actúa como mediador inflamatorio y es un poderoso atrayente para granulocitos del sistema inmune. Así como otras quimiocinas, la CXCL es secretada tanto por células del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, y macrófagos) como no inmunes (células epiteliales, endoteliales, y fibroblastos). Algunos estudios han mostrado que los niveles de expresión de CXCL5 son concordantes con la progresión del tumor. Esta quimiocina juega múltiples roles en la etiología de las enfermedades proliferativas de la próstata, tanto benignas como malignas.

Varias quimiocinas y citoquinas han sido reportadas como asociadas a HPB. Las citoquinas y quimiocinas CXC que se encuentran específicamente asociadas con HPB incluyen IL-1 α (88), IL-2(89), IL-8(90, 91), IL-15 e IL-17 (92, 93). La IL-8 estimula la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) *in vitro* (91, 94). La implicación de la IL-8 ha sido universalmente observada en varios desordenes proliferativos y en sitios de inflamación. Esta es una quimiocina multifuncional que regula varios mecanismos de respuesta inmune del huésped y de reparación de heridas. La expresión elevada de varias interleucinas y otras citoquinas conocidas por estar asociadas con reparación de tejidos han sido reportadas en HPB(95-97).

III. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Nuestros resultados muestran que efectivamente existen diferencias en el perfil de expresión de quimiocinas entre líneas celulares de CaP con diferentes comportamientos metastásicos. Dentro de las quimiocinas sobreexpresadas se encontraron la CXCL1, CXCL8 y CCL2, las cuales han sido previamente descritas en CaP. Sin embargo, se destaca que estas quimiocinas promueven la angiogénesis y por ello su asociación al fenotipo altamente metastásico. Consistente con esto, este perfil de expresión se observó en sobrenadantes y exosomas de la línea PC3 altamente metastásica.

En el microambiente *in vitro* pensamos que los exosomas contribuyen a la comunicación entre células epiteliales tumorales que favorecen el crecimiento y la proliferación. Aunque no evaluamos exosomas en suero de pacientes con cáncer de próstata la literatura sugiere que los exosomas liberados por el tumor inducen características moleculares que hacen que las células malignas abandonen el sitio primario del tumor, y por vía quimiotáctica, facilite la migración de células neoplásicas a nódulos linfáticos, donde los exosomas establecen un apoyo al ambiente que promueve la metástasis. (57).

Además, otros trabajos han revelado que los exosomas liberados por el tumor ejercen un amplia gama de efectos perjudiciales en el sistema inmune (98, 99), que van desde la apoptosis de células T citotóxicas activadas y el deterioro de la maduración de las células dendríticas que inducen a las células supresoras mieloides y a las células treg.

De otra parte, tenemos que la línea celular LNCaP posee un perfil de expresión de quimiocinas inflamatorias diferente al de su contraparte PC-3. Probablemente el perfil con niveles bajos de quimiocinas proinflamatorias expresado por las células LNCaP solo es suficiente para hacer metástasis pobremente hasta nódulo linfático (71, 100).

Al validar los resultados para las quimiocinas CXCL1 y CXCL8 en los sobrenadantes de las células en cultivo, encontramos una fuerte asociación entre la secreción de CXCL1 y CXCL8 con la agresividad de CaP. Esto sugiere que el nivel de inflamación aportado por las células epiteliales al microambiente del tumor incide en la agresividad del cáncer de próstata.

Hubo diferencias de expresión entre las quimiocinas expresadas por la línea celular PC-3 y las quimiocinas presentes en las muestras de suero de pacientes con cáncer de próstata. Como lo habíamos mencionado antes, la línea celular PC-3 sobre-expresó quimiocinas proinflamatorias angiogénicas CXCL1 y CXCL8 asociadas al fenotipo metastásico mientras que en el suero de pacientes encontramos otro perfil caracterizado por CCL3, CXCL1, CXCL5, CCL4, CXCL8 y CCL2. Aunque CXCL1, CXL8 y CCL2 han sido previamente reportadas en CaP, las quimiocinas CCL3, CCL4 y CCL5 inducen migración dependiente de fosfolipasa C (PLC)(101).

Tomados en conjunto, nuestros resultados apoyan la noción que el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna son dos entidades clínicas influenciadas de forma diferente por las quimiocinas proinflamatorias. Así mismo, los resultados obtenidos con las líneas celulares demuestran que los diferentes fenotipos del cáncer de próstata se encuentran asociados a diferentes perfiles de quimiocinas proinflamatorias. Se requieren estudios adicionales dirigidos a determinar la participación funcional de cada una de las quimiocinas proinflamatorias en el desarrollo y comportamiento de cada una de estas entidades clínicas: hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata, y cáncer de próstata metastásico. Además, es necesario que se realicen estudios dirigidos a determinar la utilidad potencial como marcadores de diagnóstico, pronóstico y/o como blancos terapéuticos, de las quimiocinas proinflamatorias identificadas diferencialmente expresadas en estas condiciones clínicas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Cartagena por la financiación del proyecto titulado “***Evaluación de la expresión de quimiocinas y sus receptores dirigida a la identificación de nuevos biomarcadores de metástasis del cáncer de próstata***” aprobado mediante Resolución # 4670-2012, sexta convocatoria para la financiación de proyectos de investigación año 2012.

BIBLIOGRAFIA

1. Guess HA. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiologic reviews*. 2013;23(1):152-8.
2. Roehrborn C. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *International journal of impotence research*. 2008;20:S11-S8.
3. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *The Journal of urology*. 1984;132(3):474-9.
4. Schauer IG, Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*. 2011;82(4):200-10.
5. Adjakly M, Ngollo M, Dagdemir A, Judes G, Pajon A, Karsli-Ceppioglu S, et al., editors. Prostate cancer: The main risk and protective factors–Epigenetic modifications. *Annales d'endocrinologie*; 2015: Elsevier.
6. Thapa D, Ghosh R. Chronic inflammatory mediators enhance prostate cancer development and progression. *Biochemical pharmacology*. 2015.
7. Sciarra A, Di Silverio F, Salciccia S, Gomez AMA, Gentilucci A, Gentile V. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? *European urology*. 2007;52(4):964-72.
8. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, et al. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *European urology*. 2011;60(1):106-17.
9. Kirby RS. The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology*. 2000;56(5):3-6.
10. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Visit: <http://globocan.iarc.fr>. 2014.
11. Muñoz A. Cáncer: genes y nuevas terapias: Editorial Hélice; 1997.
12. Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schröder FH, Castro R. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *European urology*. 2009;55(4):864-75.
13. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(9):2912-23.
14. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer research*. 2002;62(11):3298-307.
15. Bechis SK, Otsetov AG, Ge R, Olumi AF. Personalized medicine for the management of benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology*. 2014;192(1):16-23.
16. Ficarra V, Sekulovic S, Zattoni F, Zazzera M, Novara G. Why and how to evaluate chronic prostatic inflammation. *European Urology Supplements*. 2013;12(5):110-5.
17. Cancer IAfRo. GLOBOCAN 2008, section of cancer information. 2008.
18. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2010. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2013.[based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER website, April 3]. 2013.
19. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62(1):10-29.
20. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clinical epidemiology*. 2012;4:1.
21. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature immunology*. 2008;9(9):949-52.

22. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome biology*. 2006;7(12):243.
23. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(12):907-18.
24. Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *The Journal of pathology*. 2012;226(2):148-57.
25. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
26. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*. 2002;100(12):3853-60.
27. Macoska JA. Chemokines and BPH/LUTS. *Differentiation*. 2011;82(4):253-60.
28. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 2012;60(1):199-215.
29. Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev pathmechdis Mech Dis*. 2008;3:221-47.
30. Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(26):2814-23.
31. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. 2002 May;3(5):321-30. PubMed PMID: 11967126. Epub 2002/04/23. eng.
32. van den Boorn JG, Dassler J, Coch C, Schlee M, Hartmann G. Exosomes as nucleic acid nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012 Jun 28. PubMed PMID: 22750807. Epub 2012/07/04. Eng.
33. Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A, et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res*. 2006 Sep 15;66(18):9290-8. PubMed PMID: 16982774. Epub 2006/09/20. eng.
34. Andre F, Scharz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 2002 Jul 27;360(9329):295-305. PubMed PMID: 12147373. Epub 2002/07/31. eng.
35. Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, Yamanaka N, Tasaki A, et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec;25(6A):3703-7. PubMed PMID: 16302729. Epub 2005/11/24. eng.
36. Xie Y, Bai O, Yuan J, Chibbar R, Slattery K, Wei Y, et al. Tumor apoptotic bodies inhibit CTL responses and antitumor immunity via membrane-bound transforming growth factor-beta1 inducing CD8+ T-cell anergy and CD4+ Tr1 cell responses. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7756-66. PubMed PMID: 19789353. Epub 2009/10/01. eng.
37. Xiang X, Poliakov A, Liu C, Liu Y, Deng ZB, Wang J, et al. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer*. 2009 Jun 1;124(11):2621-33. PubMed PMID: 19235923. Epub 2009/02/25. eng.
38. Wieckowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2009 Sep 15;183(6):3720-30. PubMed PMID: 19692638. Epub 2009/08/21. eng.
39. Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One*. 2010;5(7):e11469. PubMed PMID: 20661468. Epub 2010/07/28. eng.
40. 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 Feb 1;69(3):785-93. PubMed PMID: 19155311. Epub 2009/01/22. eng.

41. Soderberg A, Barral AM, Soderstrom M, Sander B, Rosen A. Redox-signaling transmitted in trans to neighboring cells by melanoma-derived TNF-containing exosomes. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jul 1;43(1):90-9. PubMed PMID: 17561097. Epub 2007/06/15. eng.
42. Chen W, Wang J, Shao C, Liu S, Yu Y, Wang Q, et al. Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. *Eur J Immunol.* 2006 Jun;36(6):1598-607. PubMed PMID: 16708399. Epub 2006/05/19. eng.
43. Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Moller T, Matteoli M, et al. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol.* 2005 Jun 1;174(11):7268-77. PubMed PMID: 15905573. Epub 2005/05/21. eng.
44. Alderton GK. Metastasis. Exosomes drive premetastatic niche formation. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(7):447. PubMed PMID: 22722393. Epub 2012/06/23. eng.
45. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol.* 2011 Apr;21(2):139-46. PubMed PMID: 21251983. Epub 2011/01/22. eng.
46. Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajzman ZL, Friedman M, Papsidero L, et al. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res.* 1980;37:115-32. PubMed PMID: 7384082. Epub 1980/01/01. eng.
47. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate.* 2003 Nov 1;57(3):205-25. PubMed PMID: 14518029. Epub 2003/10/01. eng.
48. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979 Jul;17(1):16-23. PubMed PMID: 447482. Epub 1979/07/01. eng.
49. Sankpal UT, Abdelrahim M, Connelly SF, Lee CM, Madero-Visbal R, Colon J, et al. Small molecule tolfenamic acid inhibits PC-3 cell proliferation and invasion in vitro, and tumor growth in orthotopic mouse model for prostate cancer. *Prostate.* 2012 Apr 2. PubMed PMID: 22473873. Epub 2012/04/05. Eng.
50. Koshida K, Konaka H, Imao T, Egawa M, Mizokami A, Namiki M. Comparison of two in vivo models for prostate cancer: orthotopic and intratesticular inoculation of LNCaP or PC-3 cells. *Int J Urol.* 2004 Dec;11(12):1114-21. PubMed PMID: 15663685. Epub 2005/01/25. eng.
51. Tuomela JM, Valta MP, Vaananen K, Harkonen PL. Alendronate decreases orthotopic PC-3 prostate tumor growth and metastasis to prostate-draining lymph nodes in nude mice. *BMC Cancer.* 2008;8:81. PubMed PMID: 18371232. Epub 2008/03/29. eng.
52. Winkelmann CT, Figueroa SD, Sieckman GL, Rold TL, Hoffman TJ. Non-invasive MicroCT Imaging Characterization and In Vivo Targeting of BB2 Receptor Expression of a PC-3 Bone Metastasis Model. *Mol Imaging Biol.* 2012 Feb 8. PubMed PMID: 22314281. Epub 2012/02/09. Eng.
53. Webber MM, Bello D, Kleinman HK, Wartinger DD, Williams DE, Rhim JS. Prostate specific antigen and androgen receptor induction and characterization of an immortalized adult human prostatic epithelial cell line. *Carcinogenesis.* 1996 Aug;17(8):1641-6. PubMed PMID: 8761420. Epub 1996/08/01. eng.
54. Elkahwaji JE. The role of inflammatory mediators in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Research and reports in urology.* 2013;5:1.
55. Jorgenson TC, Zhong W, Oberley TD. Redox imbalance and biochemical changes in cancer. *Cancer research.* 2013;73(20):6118-23.
56. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-99.
57. Zhang H-G, Grizzle WE. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *The American journal of pathology.* 2014;184(1):28-41.
58. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research.* 2008;14(21):6735-41.

59. Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, et al. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(11):4117-27.
60. Uehara H, Troncoso P, Johnston D, Bucana CD, Dinney C, Dong Z, et al. Expression of interleukin-8 gene in radical prostatectomy specimens is associated with advanced pathologic stage. *The Prostate*. 2005;64(1):40-9.
61. Araki S, Omori Y, Lyn D, Singh RK, Meinbach DM, Sandman Y, et al. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. *Cancer research*. 2007;67(14):6854-62.
62. Maxwell PJ, Coulter J, Walker SM, McKechnie M, Neisen J, McCabe N, et al. Potentiation of inflammatory CXCL8 signalling sustains cell survival in PTEN-deficient prostate carcinoma. *European urology*. 2013;64(2):177-88.
63. Miyake M, Lawton A, Goodison S, Urquidi V, Rosser CJ. Chemokine (CXC motif) ligand 1 (CXCL1) protein expression is increased in high-grade prostate cancer. *Pathology-Research and Practice*. 2014;210(2):74-8.
64. Benelli R, Stigliani S, Minghelli S, Carlone S, Ferrari N. Impact of CXCL1 overexpression on growth and invasion of prostate cancer cell. *The Prostate*. 2013;73(9):941-51.
65. Kuo P-L, Shen K-H, Hung S-H, Hsu Y-L. CXCL1/GRO α increases cell migration and invasion of prostate cancer by decreasing fibulin-1 expression through NF- κ B/HDAC1 epigenetic regulation. *Carcinogenesis*. 2012:bgs299.
66. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*. 1999;286(5447):2098-102.
67. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *European Journal of Cancer*. 2006;42(6):768-78.
68. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular cell*. 1998;2(3):305-16.
69. Sallusto F. The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune response. *Experimental Dermatology*. 2002;11(5):476-8.
70. Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, Morgan T, Addison CL, Morris SB, et al. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *The American journal of pathology*. 1999;154(5):1503-12.
71. Aalinkeel R, Nair MP, Sufrin G, Mahajan SD, Chadha KC, Chawda RP, et al. Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer research*. 2004;64(15):5311-21.
72. Richmond A, Lawson DH, Nixon DW, Chawla RK. Characterization of autostimulatory and transforming growth factors from human melanoma cells. *Cancer research*. 1985;45(12 Part 1):6390-4.
73. Richmond A, Balentien E, Thomas H, Flaggs G, Barton D, Spiess J, et al. Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to beta-thromboglobulin. *The EMBO journal*. 1988;7(7):2025.
74. Dhawan P, Richmond A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *Journal of leukocyte biology*. 2002;72(1):9-18.
75. Cheng W-L, Wang C-S, Huang Y-H, Tsai M-M, Liang Y, Lin K-H. Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer. *Annals of oncology*. 2011:mdq739.
76. Bolitho C, Hahn MA, Baxter RC, Marsh DJ. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocrine-related cancer*. 2010;17(4):929-40.
77. Zhang J, Lu Y, Pienta KJ. Multiple roles of chemokine (CC motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010.

78. Loberg RD, Ying C, Craig M, Yan L, Snyder LA, Pienta KJ. CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration. *Neoplasia*. 2007;9(7):556-62.
79. Zhang J, Patel L, Pienta KJ. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(1):41-8.
80. Izumi K, Fang LY, Mizokami A, Namiki M, Li L, Lin WJ, et al. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(9):1383-401.
81. Chen CD, Sawyers CL. NF- κ B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(8):2862-70.
82. Jin RJ, Lho Y, Connelly L, Wang Y, Yu X, Saint Jean L, et al. The nuclear factor- κ B pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth. *Cancer research*. 2008;68(16):6762-9.
83. Shukla S, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Marengo SR, Gupta S. Nuclear factor- κ B/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia*. 2004;6(4):390-400.
84. Ismail A, Lessard L, Mes-Masson AM, Saad F. Expression of NF- κ B in prostate cancer lymph node metastases. *The Prostate*. 2004;58(3):308-13.
85. Fradet V, Lessard L, Bégin LR, Karakiewicz P, Masson A-MM, Saad F. Nuclear factor- κ B nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer. *Clinical cancer research*. 2004;10(24):8460-4.
86. Blanpain C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, Doranz BJ, Govaerts C, et al. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood*. 1999;94(6):1899-905.
87. Cheung R, Malik M, Ravyn V, Tomkowicz B, Ptasznik A, Collman RG. An arrestin-dependent multi-kinase signaling complex mediates MIP-1 β /CCL4 signaling and chemotaxis of primary human macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(4):833-45.
88. Giri D, Ittmann M. Interleukin-1 α is a paracrine inducer of FGF7, a key epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia. *The American journal of pathology*. 2000;157(1):249-55.
89. Royuela M, De Miguel MP, Bethencourt FR, Fraile B, Arenas MI, Paniagua R. IL-2, its receptors, and bcl-2 and bax genes in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates: immunohistochemical comparative analysis. *Growth Factors*. 2000;18(2):135-46.
90. Penna G, Mondaini N, Amuchastegui S, Degli Innocenti S, Carini M, Giubilei G, et al. Seminal plasma cytokines and chemokines in prostate inflammation: interleukin 8 as a predictive biomarker in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and benign prostatic hyperplasia. *European urology*. 2007;51(2):524-33.
91. Castro P, Xia C, Gomez L, Lamb DJ, Ittmann M. Interleukin-8 expression is increased in senescent prostatic epithelial cells and promotes the development of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*. 2004;60(2):153-9.
92. Handisurya A, Steiner GE, Stix U, Ecker RC, Pfaffeneder-Mantai S, Langer D, et al. Differential expression of interleukin-15, a pro-inflammatory cytokine and T-cell growth factor, and its receptor in human prostate. *The Prostate*. 2001;49(4):251-62.
93. Steiner GE, Djavan B, Kramer G, Handisurya A, Newman M, Lee C, et al. The picture of the prostatic lymphokine network is becoming increasingly complex. *Reviews in urology*. 2002;4(4):171.
94. Giri D, Ittmann M. Interleukin-8 is a paracrine inducer of fibroblast growth factor 2, a stromal and epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia. *The American journal of pathology*. 2001;159(1):139-47.
95. Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Experimental gerontology*. 2005;40(3):121-8.
96. Eaton AD, Xu D, Garside P. Administration of exogenous interleukin-18 and interleukin-12 prevents the induction of oral tolerance. *Immunology*. 2003;108(2):196-203.

97. Steiner GE, Stix U, Handisurya A, Willheim M, Haitel A, Reithmayr F, et al. Cytokine expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue. *Laboratory investigation*. 2003;83(8):1131-46.
98. Chaput N, Théry C, editors. *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. *Seminars in immunopathology*; 2011: Springer.
99. Taylor D, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *British journal of cancer*. 2005;92(2):305-11.
100. Tešan T, Gustavsson H, Welén K, Damber JE. Differential expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor in androgen-independent prostate cancer models. *BJU international*. 2008;102(8):1034-9.
101. Cardaba CM, Jacques R, Barrett J, Hassell K, Kavanagh A, Remington F, et al. CCL3 induced migration occurs independently of intracellular calcium release. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;418(1):17-21.