



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

La progresión del cáncer de próstata mediante la vía de señalización TGF- β favorece la modificación de los pericitos y la disfuncionalidad vascular

Anabel Martínez Romero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Universitat de Barcelona
2023
Programa de Doctorado en Biomedicina

LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN TGF- β FAVORECE LA MODIFICACIÓN DE LOS PERICITOS Y LA DISFUNCIONALIDAD VASCULAR

Memoria de tesis doctoral presentada por **Anabel Martínez Romero** para optar
al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Doctoranda,
Anabel Martínez Romero

Directora,
Dra. Mariona Graupera Garcia-Milà

Director,
Dr. Arkaitz Carracedo Pérez

Tutor,
Dr. Francesc Viñals Canals

Affidavit

La tesis titulada “La progresión del cáncer de próstata mediante la vía de señalización TGF- β favorece la modificación de los pericitos y la disfuncionalidad vascular” ha sido llevada a cabo por Anabel Martínez Romero en el laboratorio de *Fisiopatología endotelial y del microambiente*, primero en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), y finalmente en el Instituto de Investigación Contra la Leucemia Josep Carreras (IJC), siempre bajo la dirección de la Dra. Mariona Graupera y el Dr. Arkaitz Carracedo. La escritura de esta memoria ha sido llevada a cabo íntegramente por su autora. La información obtenida de otras fuentes de la literatura ha sido debidamente citada en el texto y se provee de la lista de referencias al final de esta obra. Este trabajo no ha sido presentado para ningún otro tipo de reconocimiento en esta ni otras instituciones.

Soporte financiero

Esta tesis ha contado con el soporte financiero de:

- Asociación española contra el cáncer
- Las propias instituciones en que se ha desarrollado el proyecto: IDIBELL, IJC



Josep Carreras
LEUKAEMIA
Research Institute

CIC bioGUNE
CENTER FOR COOPERATIVE RESEARCH IN BIOSCIENCES

 **asociación
española
contra el cáncer**

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
ABREVIATURAS Y GLOSARIO	13
Abreviaturas	13
Glosario de términos en inglés	18
INTRODUCCIÓN.....	21
1. Cáncer.....	21
1.1. Cáncer de próstata.....	23
1.1.1. Incidencia y etiología.....	23
1.1.2. Factores de riesgo.....	24
1.1.3. Detección y sintomatología.....	24
1.1.4. Anatomía de la próstata y origen neoplásico	25
1.1.4.1. <i>Zona periférica</i>	25
1.1.4.2. <i>Zona transicional</i>	25
1.1.4.3. <i>Zona central</i>	26
1.1.5. Progresión tumoral	27
1.1.6. Tratamiento y supervivencia.....	29
2. Células estromales.....	29
2.1. Sistema inmune	30
2.2. Vasos linfáticos	31
2.3. Nervios	31
2.4. Fibroblastos y fibroblastos asociados a cáncer	32
2.5. Vasos sanguíneos	35
2.5.1. Angiogénesis.....	35
2.5.1.1. <i>Angiogénesis tumoral</i>	35
2.5.2. Composición celular de los vasos sanguíneos	36
2.5.2.1. <i>Células endoteliales</i>	36
2.5.2.2. <i>Células murales</i>	37
3. La vía de señalización TGF- β	40
3.1. Señalización en cáncer.....	42
3.2. Señalización en cáncer de próstata.....	43
3.3. Señalización en vasos sanguíneos y células murales	43

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1. Experimentación <i>in vivo</i>	51
1.1. Modelos de ratón	51
1.1.1. Modelos tumorales con Probasin-Cre	51
1.1.2. Modelos ortotópicos	52
1.1.2.1. Tumores ortotópicos procedentes de células DU145.....	53
1.1.2.2. Tumores ortotópicos procedentes de tumores <i>Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}, LKB1^{flox/flox}</i>	53
1.2. Aislamiento de próstata	54
1.2.1. Extracción del lóbulo ventral.....	54
1.2.2. Extracción del lóbulo dorso-lateral.....	54
1.2.3. Extracción del lóbulo anterior	54
1.3. Genotipado por PCR.....	55
1.4. Inclusión de muestras en parafina	56
1.5. Secciones de tejidos en parafina	57
1.6. Biopsias humanas	57
1.7. Tinción de próstatas por inmunofluorescencia	57
1.8. Microscopia electrónica	58
1.9. Microscopia Confocal.....	59
1.10. Cuantificaciones estromales de la próstata de ratón y humana	60
1.10.1. Estructuras vasculares.....	60
1.10.2. Área luminal de los vasos sanguíneos.....	60
1.10.3. Área positiva para CD31, DES y α SMA.....	60
1.10.4. Área de cobertura vascular positiva para DES, α SMA y MYH11	60
1.10.5. Área de eritrocitos extravasados.....	61
1.10.6. Presencia o ausencia de pericitos (Microscopia electrónica).....	61
2. Experimentación <i>in vitro</i>	61
2.1. Aislamiento, digestión y selección de pericitos de cerebro de ratón.....	61
2.2. Tratamiento farmacológico.....	62
2.2.1. Activación de TGF- β	63
2.2.2. Inhibición de TGF β -R.....	63
2.3. Extracción de ARN, síntesis de cADN y qPCR	63
2.4. Extracción de proteína y <i>western blot</i>	64

3. Experimentación <i>in silico</i>	66
3.1. CancerTool	66
3.1.1. Análisis bioinformático de correlación positiva con desmina.....	66
3.2. Análisis de próstatas por secuenciación de células individuales (<i>scRNAseq</i>)	67
3.2.1. Análisis de ligando-receptor.....	67
3.2.2. Análisis de fenotipo de respuesta a la señalización de TGF- β	67
3.3. Análisis de <i>scRNAseq</i> de datos humanos publicados sobre cáncer de próstata	68
3.4. Análisis transcriptómico	70
3.5. Análisis estadístico	70
RESULTADOS	73
1. Caracterización de pericitos en el cáncer de próstata.....	73
1.1. La progresión tumoral produce una pérdida de marcadores de pericitos/células murales en muestras humanas analizadas <i>in silico</i>	73
1.2. La presencia tumoral en modelos murinos muestra un incremento en la angiogénesis	75
1.3. La expresión de desmina en áreas perivasculares disminuye con la agresividad tumoral	76
1.4. La cobertura del vaso se mantiene aún con el avance de la enfermedad ..	78
1.5. La pérdida de desmina en la cobertura vascular depende de la agresividad tumoral	80
1.6. Las muestras humanas muestran un comportamiento similar en la expresión de desmina en los vasos sanguíneos ante la agresividad del tumor.....	83
1.7. La cobertura del vaso no se ve modificada por la agresividad tumoral	86
2. La señalización de TGF- β produce la pérdida de expresión de desmina y un cambio de identidad en los pericitos/células murales.....	89
2.1. Las células murales procedentes de muestras tumorales tienen un mayor fenotipo de respuesta a TGF- β	89
2.2. Los datos humanos validan la importancia de TGF- β en las células murales tumorales	93
2.3. Los pericitos tratados con TGF- β <i>in vitro</i> pierden expresión de desmina y ganan expresión en marcadores fibroblásticos	97
3. La funcionalidad del vaso se ve afectada por la pérdida de desmina en los vasos sanguíneos	100
3.1. La contractilidad vascular está afectada negativamente por la modificación de los pericitos	100
3.2. El lumen vascular se incrementa con la progresión de tumor.....	104

3.3. La agresividad del tumor produce una afectación en los pericitos promoviendo la extravasación.....	104
4. El inhibidor de TGF- β <i>in vitro</i> favorece la recuperación de desmina y otros marcadores a sus estados basales	106
DISCUSIÓN.....	111
CONCLUSIONES	123
REFERENCIAS	127

RESUMEN

El cáncer de próstata (PCa) es el segundo cáncer más frecuente y la quinta causa de muerte por cáncer en varones en todo el mundo. El PCa primario es heterogéneo, mientras que el PCa metastásico presenta menos variabilidad intra-paciente. Los tumores contienen una compleja mezcla células no cancerosas y componentes de la matriz que se denominan colectivamente estroma tumoral. Esto es particularmente relevante en el PCa en el cual el compartimento estromal ha sido en gran medida poco explorado. Los nuevos estudios han documentado la importancia de estas células no cancerosas en la evolución tumoral y como una nueva oportunidad para la orientación terapéutica. Centrándonos en la angiogénesis, las células endoteliales son el principal tipo celular que forma la vasculatura (arterias, venas y capilares). Los vasos necesitan el apoyo de otras células como los pericitos, que son células murales que rodean los microvasos y mantienen la cohesión entre las células endoteliales y la membrana basal. Una baja cobertura de pericitos en los vasos tumorales se asocia a una mayor metástasis en modelos de ratón de cáncer de mama y a mayores tasas de mortalidad en pacientes. Además, en algunas patologías fibróticas se describe un cambio de fenotipo de los pericitos. Esta tesis se centra en el estudio de cuatro cuestiones clave que siguen siendo enigmáticas en este contexto: caracterizar los pericitos en próstata, identificar el mecanismo patológico que modifica el perfil molecular de los pericitos en condiciones tumorales, estudiar las disfuncionalidades vasculares y modelizar un estudio de rescate.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer and the fifth cause of death by cancer in males worldwide. Primary PCa is heterogeneous whereas metastatic PCa exhibits less intra-patient variability, with distant metastases. Tumours contain a complex mixture of noncancerous cells types and matrix components that are collectively referred to as the tumour stroma. This is particularly relevant, in that specific in PCa neoplasia in which the stromal compartment has been largely underexplored. Emerging studies have documented the relevance of these noncancerous cells in tumour evolution and as a new opportunity for therapeutic targeting. Focusing on angiogenesis, endothelial cells are the main cell type forming the vasculature (arteries, veins and capillaries). Vessels need the support of other cells as pericytes, which are mural cells surrounding microvessels and embedded within the basement membrane. Low pericyte coverage in tumour vessels is associated with enhanced metastasis in mouse models of breast cancer and with higher mortality rates in patients. Moreover, in some fibrotic pathologies, a pericytes' change of phenotype is described. This thesis focuses on the study of four key questions that remain enigmatic in this context: characterize pericytes in prostate, identify the pathological mechanism that modify pericyte molecular profile in tumour conditions, study vascular dysfunctionalities and model a rescue study.

ABREVIATURAS Y GLOSARIO

Abreviaturas

ACL _P (AEBP ₁)	<i>AE binding protein 1</i>
ACTA ₁	Actina α 1 (<i>Actin α 1</i>)
ACTA ₂	Actina α 2 (<i>Actin α 2</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT (PKB)	<i>Protein kinase B</i>
AMH	Hormona antimülleriana (<i>anti-Müllerian hormone</i>)
ANPEP	<i>Alanyl Aminopeptidase</i>
AR	Receptor de andrógenos (<i>Androgen receptor</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
cADN	ADN complementario
CAF	Fibroblastos asociados al cáncer (<i>Cancer associated fibroblasts</i>)
CCL ₃	<i>Chemokine (C-C Motif) Ligand 3</i>
CD ₂₄₈	Endosialina (<i>Endosialin</i>)
CD ₃₃	Siglec-3 o molécula CD ₃₃
CD _{3E}	Molécula CD ₃ epsilon
CD _{3G}	Molécula CD ₃ gamma
CD ₄	Molécula CD ₄
CD ₄₅	Molécula CD ₄₅
CD ₆₈	Molécula CD ₆₈
CD _{79A}	Molécula CD ₇₉ alfa
CD _{79B}	Molécula CD ₇₉ beta

CD8A	Molécula CD8 alfa
CD8B	Molécula CD8 beta
CD90	Molécula CD90
CLDN5	Claudina 5
COL1A2	Cadena alfa 2 de colágeno tipo I (<i>Collagen type II alpha 2 chain</i>)
COL3A1	Cadena alfa 1 de colágeno tipo III (<i>Collagen type I alpha 1 chain</i>)
CRPC	Cáncer de próstata resistente a castración
CSPG4	Proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (<i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4</i>)
CTHRC1	<i>Collagen triple helix repeat containing 1</i>
CXCL12	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCN	Decorina (<i>Decorin</i>)
DDSA	<i>Dodecenylsuccinic anhydride</i>
DES	Desmina (<i>Desmin</i>)
DFS	Supervivencia libre de enfermedad (<i>Disease-free survival</i>)
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMP-30	<i>2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol</i>
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
EC	Célula endotelial (<i>Endothelial cell</i>)
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPCAM	Molécula de adhesión celular epitelial (<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAP	Proteína alfa de activación de fibroblastos (<i>Fibroblast Activation Protein Alpha</i>)

FB	Fibroblasto (<i>Fibroblast</i>)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FLT1	<i>Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1</i>
FSP1	Proteína 1 específica de fibroblastos (<i>Fibroblast-specific protein 1</i>)
GDF	Growth Differentiation Factors
GDNF	Glial-derived Neurotrophic Factors
H&E	Hematoxilina & Eosina
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
Hvg	Genes altamente variables (<i>Highly variable genes</i>)
IB4	Isolectina B4
IF	Inmunofluorescencia (<i>ImmunoFluorescence</i>)
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>)
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
Isoflurano	1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter
ITGAM	Integrina alfa M (<i>Integrin Subunit Alpha M</i>)
KDa	Kilodaltons
KRT14	Queratina 14 (<i>Keratin 14</i>)
KRT17	Queratina 17 (<i>Keratin 17</i>)
LEC	Células endoteliales linfáticas (<i>Lymphatic endothelial cells</i>)
LKB1	Quinasa hepática B1 (<i>Liver kinase B1</i>)
mARN	ARN mensajero
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MS4A1	<i>Membrane Spanning 4-Domains A1</i>

mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
MYH11	Miosina 11 (<i>Myosin heavy chain 11</i>)
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NG2	<i>Neural glial 2</i>
NK	<i>Natural killers</i>
NMA	<i>Nadic Methyl Anhydride</i>
NOTCH3	<i>Notch Receptor 3</i>
O/N	Toda la noche (<i>Overnight</i>)
pb	Pares de bases
Pb-Cre4	<i>Androgen-dependent ARR₂B probasin promoter</i>
PBS	Tampón salino con fosfato (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCa	Cáncer de próstata (<i>Prostate cancer</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal Components Analysis</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>)
PDPN	Podoplanina (<i>Podoplanin</i>)
PECAM1	Molécula endotelial de adhesión a plaquetas-1 (<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>)
PFA	Paraformaldehído
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase</i>
PSA	<i>Prostate-specific antigen</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homologue</i>
qPCR	PCR cuantitativa (<i>quantitative PCR</i>)

RGS5	Regulador de la señalización de la proteína G 5 (<i>Regulator of G Protein Signaling 5</i>)
RT	Temperatura ambiente (<i>Room temperature</i>)
scRNAseq	Secuenciación del ARN de células individuales (<i>Single-Cell RNA sequencing</i>)
SM22a	Proteína 22-alfa de músculo liso (<i>Smooth muscle protein 22α</i>)
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic</i>
SM-MHC	Cadena pesada de Miosina de músculo liso (<i>Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</i>)
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
TAM	Macrófagos asociados al tumor (<i>Tumor associated macrophages</i>)
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TEMED	Tetrametiletilendiamina (<i>TEtraMethylEthyleneDiamine</i>)
Ter119 (Ly76)	<i>Lymphocyte anatigen 76</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TGF- β R	Receptor de factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta receptor</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
TPA	Terapia por privación de andrógenos
UMAP	Aproximación y Proyección de Variedad Uniforme (<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>)
VEGF	<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>
VIM	Vimentina (<i>Vimentin</i>)
vSMA	Células vasculares de músculo liso (<i>vascular Smooth Muscle Cells</i>)
α SMA	Actina α de músculo liso (<i>α Smooth muscle Actin</i>)

Glosario de términos en inglés

Batch effect	Efecto por lotes
Box plot	Diagrama de cajas
Clustering	Agrupación
Datasets	Conjunto de datos
Goat	Cabra
Monkey	Mono
Mouse	Ratón
Rabbit	Conejo
Rat	Rata
Threshold	Umbral
Violin plot	Diagrama de violines
Wildtype	Tipo salvaje

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad que afecta a toda la población mundial (1). En 2018 se realizó la última estimación sobre mortalidad, siendo el cáncer la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares. Los riesgos que incrementan las posibilidades de desarrollar cáncer incluyen factores incontrolables como la edad, la historia familiar o la inestabilidad genética; y controlables como el tabaco, la mala alimentación o la vida sedentaria (2). La carcinogénesis es un proceso multifactorial que incluye mutaciones secuenciales y/o epigenéticas, pérdida de control en la proliferación celular y desregulación homeostática (1,3). Estos factores hacen que el cáncer tenga un espectro de malignidad y agresividad muy amplio (1).

A nivel genético, se puede caracterizar el cáncer según si el daño se encuentra en oncogenes o en genes supresores de tumor (1,3,4). En condiciones normales, los tejidos tienen proto-oncogenes, los cuales regulan procesos biológicos fundamentales como diferenciación celular y proliferación. Estos proto-oncogenes pueden ser factores de crecimiento, factores de transcripción o transductores de señales celulares. Cuando un proto-oncogén se activa se transforma en oncogén (5). El término oncogén fue descrito por George Todaro y Robert Huebner en 1969 y hace referencia a cualquier gen que tenga el potencial de provocar el crecimiento celular descontrolado/anárquico (1). Actualmente, hay entre 50 y 60 oncogenes reconocidos (5). Los oncogenes pueden verse activados por mutaciones puntuales (por ejemplo, *K-ras*), por amplificaciones (p.e., *Myc*) e inserciones virales de promotores (1,4,5). Por otro lado, los genes supresores de tumor son los que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, además de bloquear el desarrollo del cáncer, en condiciones normales. Como son protectores de neoplasias, su alteración es un factor favorecedor de la carcinogénesis (5). Este defecto funcional se puede dar por una mutación silenciadora del gen, por pérdida del gen, por pérdida de heterocigosis o por hipermetilación de un promotor (1,4,5).

Debido a la complejidad de esta enfermedad, en el 2000 Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg describieron seis habilidades funcionales que adquieren las células normales y que son cruciales para transformarse en tumorales. Estas habilidades se nombraron como las señas de identidad del cáncer (6). En las dos últimas décadas, el estudio y el conocimiento sobre esta enfermedad ha avanzado mucho y, con ello, el número de señas de identidad se ha incrementado a catorce (**Figure I 1**) (7).

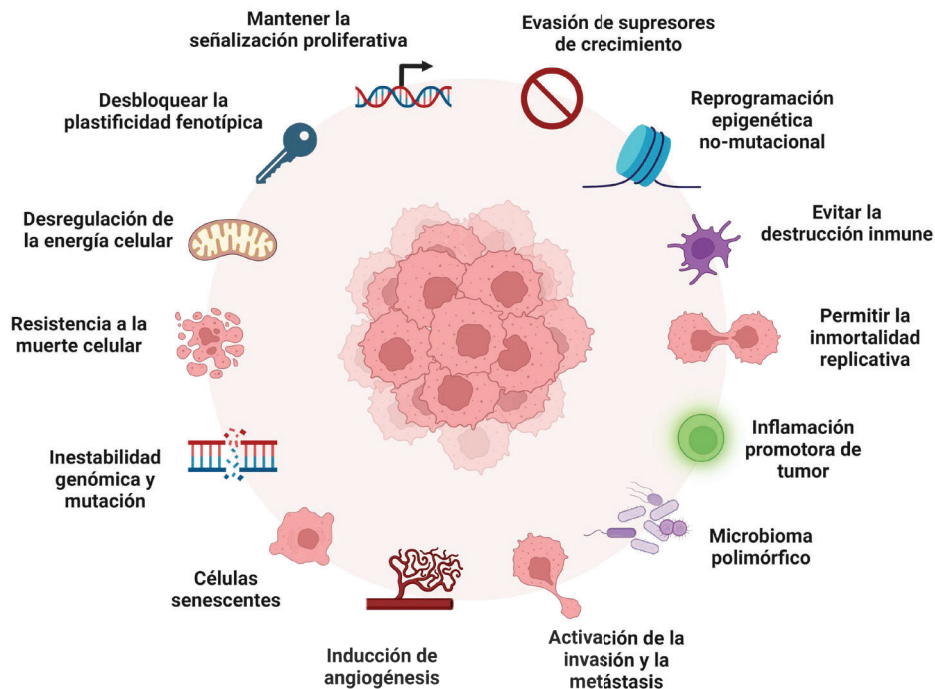


Figure I 1. Señas de identidad del cáncer

Diseño basado en Hanahan D., 2022

La carcinogénesis tiene su culmen en la colonización de otros órganos, a este proceso se le llama metástasis y fue descrita por primera vez en el 1580 (1,3,8). Mientras que los tumores primarios detectados pueden tratarse con cirugía y radiación local, incrementando las posibilidades de supervivencia, la metástasis es el principal motivo de mortalidad en pacientes debido al avanzado estadio de la enfermedad y a los reducidos métodos de tratamiento que existen (1,8,9). Los órganos más comunes donde el cáncer puede metastatizar son huesos, cerebro, hígado, nódulos linfáticos y pulmones (1).

Existen diversas causas que potencian este estadio final en la enfermedad, pero dos de las más influyentes son: la transición epitelio-mesénquima (TEM) (1) y el microambiente tumoral o células estromales (1,10). Ambas potencian la carcinogénesis, el crecimiento tumoral, la invasión, la colonización y la metástasis.

La TEM otorga características mesenquimales a las células epiteliales tales como habilidades invasivas o resistencia a la senescencia y a la apoptosis. Esta transición permite el desprendimiento y la pérdida de polaridad de las células epiteliales, las cuales migran del tumor primario a los vasos linfáticos y vasculares para invadir otros órganos (1,8). La intravasación y la extravasación suceden debido al daño en las membranas

basales y las células endoteliales de los vasos sanguíneos, los cuales son componentes del microambiente tumoral o estroma (8,9). Una vez las células tumorales colonizan otros órganos, estas pueden quedarse inactivas creando un nicho pre-metastático o pueden proliferar en el nicho dando lugar a la metástasis (**Figure I 2**) (1,8–10).

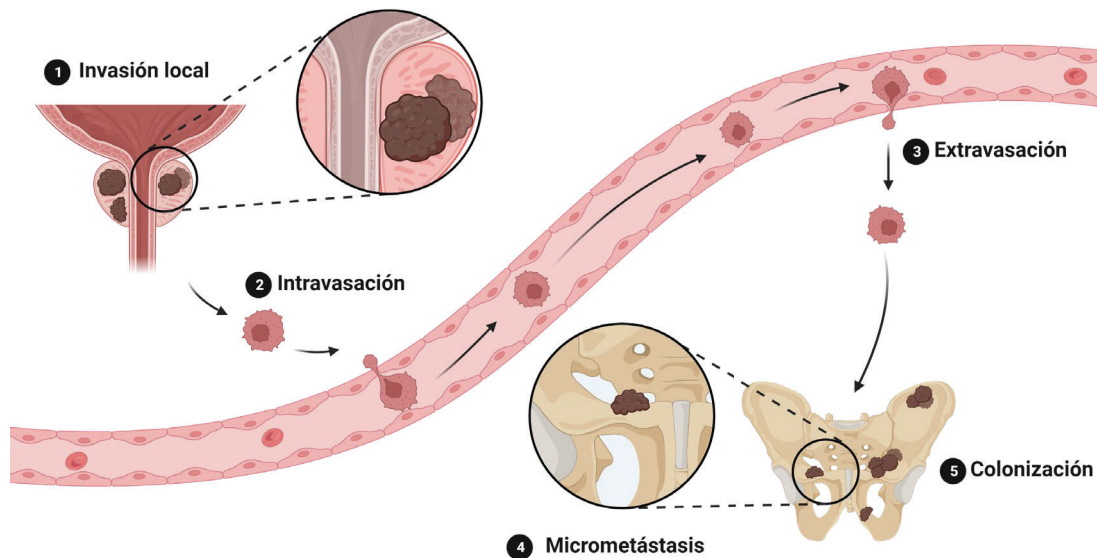


Figure I 2. Proceso de invasión y metástasis tumoral

1.1. Cáncer de próstata

1.1.1. Incidencia y etiología

El cáncer de próstata (PCa) se encuentra en segunda posición en cuanto a número de casos, pero en quinta en cuanto a mortalidad, según la última estimación mundial en 2018. Esta diferencia entre incidencia y mortalidad se debe a la temprana detección de muchos casos en estadios iniciales, los cuales son tratados con prostatectomía y/o radioterapia (2,11) (**Figura I 3**). En el 90% de los casos la metástasis es el motivo de la mortalidad (12).

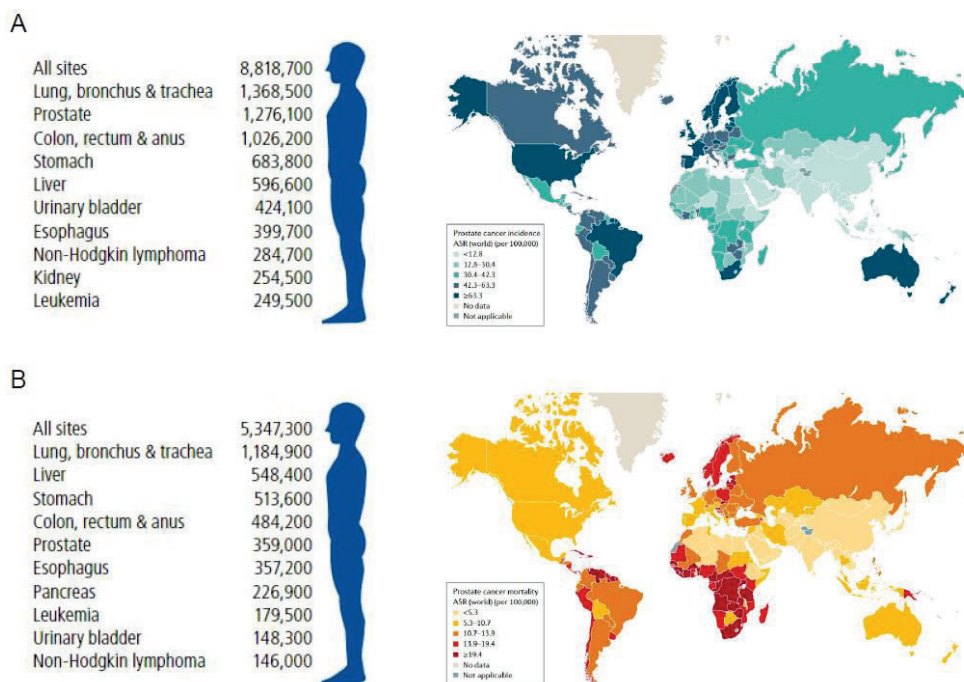


Figure I 3. Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata en 2018

(A) Número de casos estimados y distribución geográfica sobre la incidencia del PCa. (B) Número de casos estimados y distribución geográfica sobre la mortalidad del PCa. Diseño basado en *Global Cancer – Facts&Figures 4th Edition* (Kristina SA et al., 2018) y *Rebello RJ et al., 2021*.

1.1.2. Factores de riesgo

Los factores de riesgo descritos para el PCa son la edad, una historia familiar con predisposición a la enfermedad, el balance endógeno hormonal del individuo y diversos factores ambientales (2,13). En casos de PCa avanzados, el tabaco y la obesidad son factores de riesgo muy influyentes (12).

Un 10% de los casos se deben a casos familiares previos de PCa. Se sabe que hay también una asociación de alto riesgo en familias con casos de cáncer de mama previos. Los casos hereditarios suelen ser más agresivos que los demás (13).

Entre los factores ambientales más perjudiciales se encuentran la ingesta de grasas, las carnes rojas, la vitamina D y la exposición al cadmio, entre otros. Por otro lado, factores alimenticios antioxidantes (como los tomates y licopenos), pescados y productos ricos en fibras pueden ejercer un efecto protector (12,13).

1.1.3. Detección y sintomatología

La detección inicial se suele hacer con el test de *prostate-specific antigen* (PSA), una glicoproteína producida y secretada exclusivamente por la próstata (12,13). Los niveles de PSA varían según el estadio de la enfermedad: 0-2,5 ng/ml en individuos

sanos, por encima de 2,5 ng/ml es un indicativo de biopsia. El incremento de expresión de PSA va relacionado con la progresión de la enfermedad, aunque hay que tener en cuenta que una inflamación benigna, una hiperplasia o una prostatitis también dan niveles altos de PSA (12). Esta técnica de detección ha permitido incrementar el número de casos de bajo riesgo diagnosticados (14).

Los síntomas varían según el estadio. En estados iniciales no hay síntomas detectables; cuando la enfermedad avanza se debilita o se interrumpe el flujo de orina, se incrementa la frecuencia de orinar, se orina sangre y hay dolor. Cuando el cáncer de próstata está en estadios avanzados, se inicia la metástasis hacia los huesos, iniciándose en los más cercanos a la zona genital (2).

1.1.4. *Anatomía de la próstata y origen neoplásico*

La próstata es un órgano glandular localizado bajo la vejiga, delante del recto y rodeando la uretra (15). La función de la próstata consiste en la generación de fluido seminal en el proceso de reproducción (15). Una próstata normal y joven pesa en torno a 15-20 gramos (15,16) y mide 3x4x2 cm (16). La próstata está recubierta de una cápsula, de aproximadamente 0,5-1 mm, formada por colágeno, elastina y músculo liso (16,17).

La próstata humana es una única glándula dividida en tres grandes zonas: periférica, transicional y central (15,16) (**Figura I 4**). Es importante entender la anatomía de la próstata y sus zonas porque el proceso de carcinogénesis no actúa de manera homogénea en las diferentes zonas. En el tejido pueden convivir glándulas normales o hiperplásicas, neoplasia intraepitelial prostática y adenocarcinoma bien diferenciado (13,18).

1.1.4.1. *Zona periférica*

La zona periférica corresponde a un 70% del tejido prostático (15,19). El origen de esta zona procede del mesodermo (16). Las glándulas del área periférica son pequeñas y esféricas formadas por epitelio liso (17). La mayoría de tumores prostáticos (adenocarcinomas) se originan en esta zona (15,16,18), aproximadamente un 60-70% (16,17).

1.1.4.2. *Zona transicional*

La zona transicional se localiza entorno a la uretra, que atraviesa la próstata por el eje central (15,16). Se cree que el origen de esta área es endodérmico (16). Las

glándulas de la zona transicional son estructuralmente idénticas a las de la periférica, pero hay menor número (17).

En hombres jóvenes, la zona transicional constituye un 5% del tejido. En cambio, en hombres mayores esta área es el origen de la mayoría de hiperplasias benignas debido a su engrosamiento por la edad (15,16). Esto sucede especialmente en la zona transicional incluida en la zona del esfínter prostático (17). Las hiperplasias pueden dar lugar a tumores clínica y biológicamente distintos a los localizados en la zona periférica (15,16). El 20-40% de los cánceres de próstata tienen este origen (16,17).

1.1.4.3. Zona central

La zona central tiene forma cónica, su inicio se localiza en la base de la vejiga y va envolviendo los conductos eyaculadores (15,16). Esta zona corresponde al 25% del tejido prostático (19). Se cree que el origen de esta área es el conducto de Wolf (16,17,20), que también da origen a las vesículas seminales y al conducto distal deferente (20). Las glándulas de esta zona son grandes formadas por epitelio de tipo papilar (17).

Normalmente, esta zona no es origen de ninguna enfermedad primaria, aunque puede verse afectada como localización secundaria en condiciones cancerosas (15).

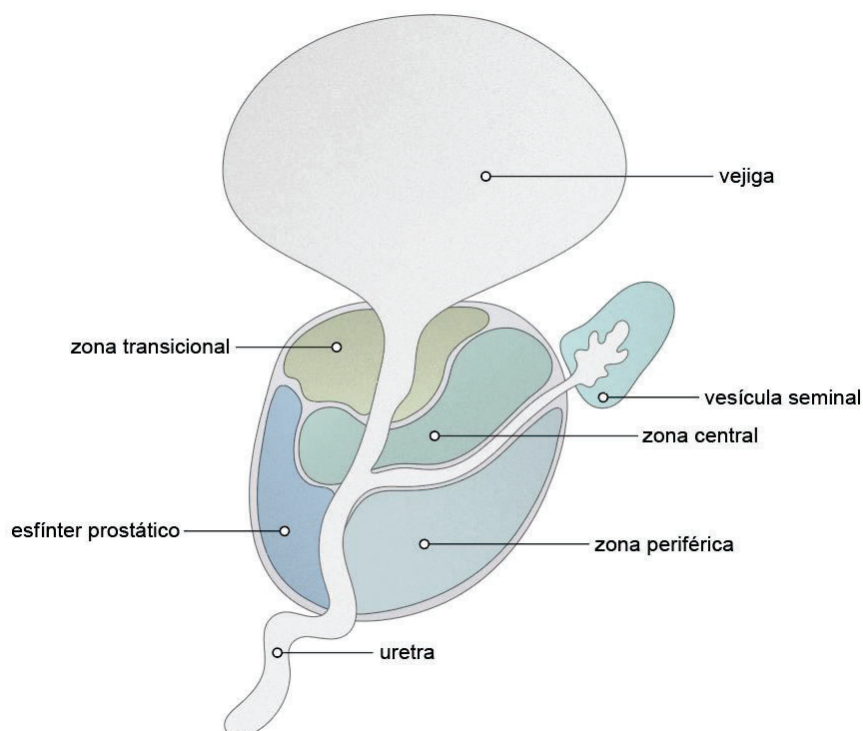


Figura I 4. Anatomía de próstata humana en vista sagital

Diseño basado en *Ittmann M., 2018*

El epitelio de la próstata está formado por tres tipos celulares: luminal, basal y neuroendocrino. Las células lumbinales contribuyen a la formación del líquido seminal mediante la secreción de una amplia variedad de productos secretados al lumen (15,19). Entre ellos se encuentra el (PSA) (15,16). Las células basales se encuentran unidas a la membrana basal y la cantidad de células puede variar entre las glándulas de una misma próstata. Las células neuroendocrinas no se pueden identificar en observaciones histológicas generales (H&E), si no que se hace mediante marcadores como la cromogranina o la sinaptofisina (15). Se cree que la mayoría de neoplasias proceden de células lumbinales (13,18).

El estroma prostático es fibromuscular con abundante mezcla de células de músculo liso, fibroblastos, vasos sanguíneos y nervios. Las fibras de músculo esquelético se encuentran mayoritariamente fuera de la próstata, en la cápsula (15). La zona central tiene la mayor densidad estromal debido a las bandas de músculo liso que rodean las glándulas, seguida de la zona transicional y, por último, de la periférica (17). Aunque la proporción estroma-epitelio es menor en la zona central que en las otras dos (17,19), las diferencias estromales entre zonas se pierden en condiciones patológicas o en próstatas sanas engrosadas por la edad (12,19).

1.1.5. *Progresión tumoral*

El estadio tumoral en el PCa se mide mediante el valor de Gleason, método propuesto en 1966, los niveles de PSA y el estadio clínico (13,21,22). El valor de Gleason consta de 2 valores numéricos que hacen referencia al grado de las dos lesiones más neoplásicas (p.ej. 3+4) (13) y se decide valorando la histología, concretamente la diferenciación glandular y el patrón del estroma (23). Existen 5 grados histológicos y el valor de Gleason se obtiene sumando los dos valores numéricos (**Figura I 5**). A mayor Gleason, mayor gravedad de carcinoma (13,23). La mayor diferencia en cuanto a agresividad se encuentra entre los grados 3 y 4, ya que es el momento en el que aparecen glándulas cribiformes (glándulas con perforaciones) (22). Además, cuando el tumor está localizado en la glándula se nombra como estadios T1-T2, mientras que si ha escapado de la glándula se nombra estadio T3 (12).

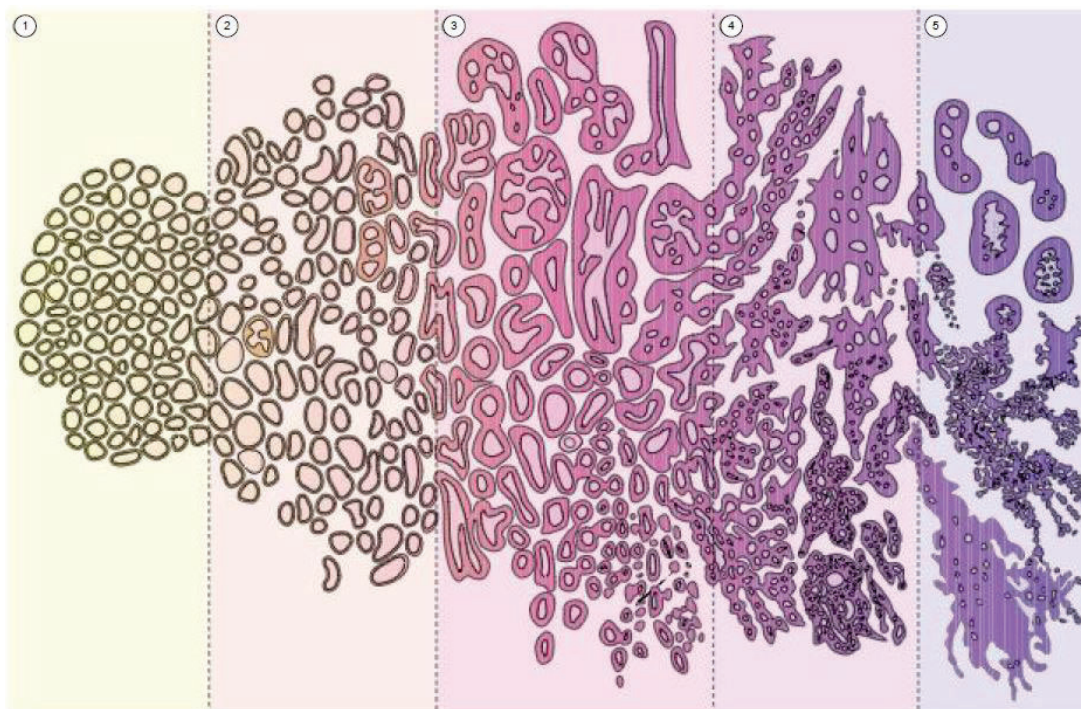


Figura I 5. Grados histológicos del valor de Gleason

Diseño modificado de *Sathianathan NJ et al., 2023*.

Los tumores de próstata suelen metastatizar en los huesos (1,24), siendo la columna vertebral, la pelvis y las costillas los lugares más frecuentes. Mayoritariamente se dan lesiones osteoblásticas. Es decir, hay una nueva formación de tejido. El microambiente del hueso se comunica con las células tumorales otorgando a estas propiedades óseas. Se detecta metástasis de huesos en un 10% de los diagnósticos iniciales (12,24).

Cuando se producen estadios más avanzados aparece metástasis en los nódulos linfáticos. Al llegar a este nivel, el pronóstico empeora y las posibilidades terapéuticas son limitadas, siendo las mejores opciones la resección de los nódulos pélvicos, la radioterapia y la terapia por privación de andrógenos (TPA). La supervivencia libre de enfermedad es dependiente del número y el estadio de metástasis en nódulos linfáticos (24). Si el cáncer sigue creciendo a pesar del tratamiento hormonal (TPA u otros), se denomina cancer de próstata resistente a castración (CRPC). Una proporción de estos CRPC sufre variaciones histológicas que dan lugar a un PCa neuroendocrino. Tanto el CRPC como el neuroendocrino son PCa extremadamente agresivos que pueden llegar a provocar metástasis en órganos viscerales (24).

1.1.6. *Tratamiento y supervivencia*

En estadios T1-T2, el cáncer se considera curable y cerca del 100% tiene una tasa de supervivencia a los 5 años. Al avanzar al estadio T3, este porcentaje cae al 29% (12). Existen tres grandes terapias para el cáncer de próstata localizado (T1-T2): prostatectomía radical, radioterapia y tratamiento de síntomas sin invasión (13,25). Realizando una prostatectomía radical, un 20-30% de los pacientes recaerán y progresarán a estadios más avanzados, de los cuales entre 70-80% sufrirán metástasis ósea tras 5 años (24,26). La prostatectomía se puede hacer con o sin radioterapia u otras terapias adyuvantes (21).

En estadios avanzados donde la metástasis ósea afecta el esqueleto axial (cráneo, esqueleto laríngeo, columna vertebral y tórax), el tratamiento paliativo es el prioritario (24). Aun así, en los casos metastáticos, la TPA sigue siendo el tratamiento más usado. La TPA consigue reducir los síntomas y el crecimiento tumoral pero la recurrencia es casi segura en casos con resistencia a la castración (12,24,25). La prostatectomía radical con disección de nódulos linfáticos en estadios avanzados reduce el riesgo de muerte (25) y se usa junto con castración química como tratamientos adyuvantes a la TPA (27).

La TPA incrementa la reabsorción ósea reduciendo la densidad mineral e incrementando el riesgo de fractura. Por ello se combina la TPA con bisfosfonatos que ayudan a la prevención de la pérdida ósea, aunque no tienen una efectividad total en cuanto a la fractura. La heterogeneidad de expresión de receptores andrógenos (AR) en células tumorales obliga al co-tratamiento con terapias de AR directas e indirectas (24).

El tiempo de supervivencia depende de diversos factores como el estadio de la enfermedad, la edad, el valor de Gleason y la distribución de la metástasis (24).

2. **Células estromales**

Las células estromales en condiciones tumorales incluyen células del sistema inmunitario, vasos linfáticos, nervios, fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) y vasos sanguíneos, los cuales están formados por células endoteliales y células murales (1) (**Figura I 6**).

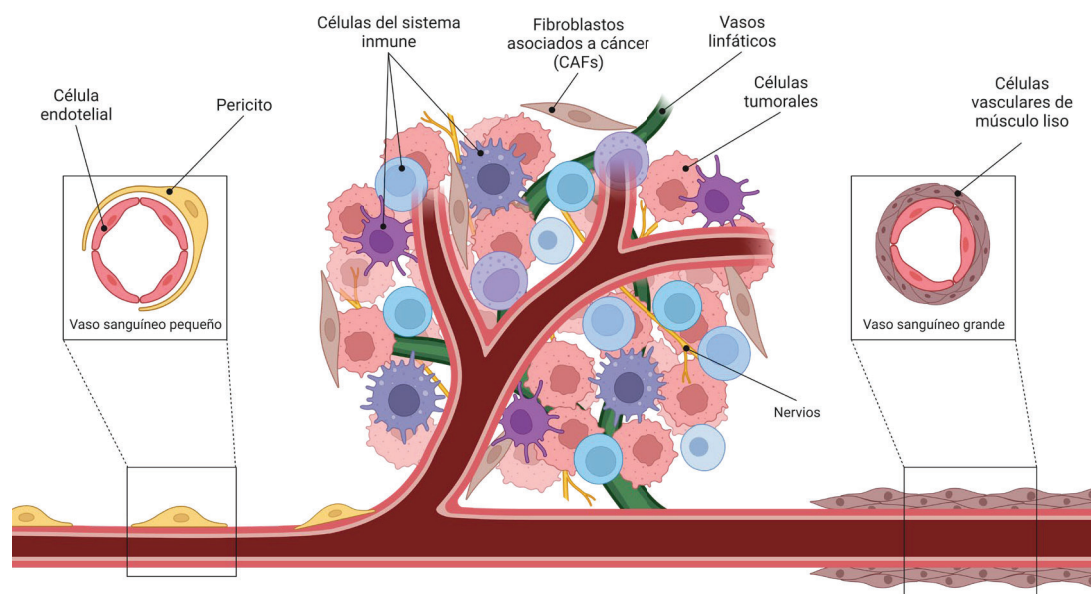


Figura I 6. Células estromales que forman el microambiente tumoral

2.1. Sistema inmune

El sistema inmune tiene como función reconocer, rechazar y erradicar patógenos y otras moléculas extrañas, ya sean exógenas o endógenas (28,29). Los órganos y tejidos que componen el sistema inmune son los glóbulos blancos y el sistema linfático que incluye el timo, el bazo, las anginas, los nódulos y vasos linfáticos y la médula ósea (29). La inmunidad se rige por dos respuestas distintas: la innata y la adaptativa. La respuesta innata es rápida, pero puede provocar inespecificidades ya que es independiente de antígenos; la adaptativa se desarrolla en días o semanas, pero es más precisa. Además, la respuesta adaptativa crea memoria lo que permite una respuesta más rápida y vigorosa cuando un patógeno vuelve a ser detectado (28,29).

Cuando el sistema inmune falla se producen problemas como autoinmunidad, alergias, infecciones o tumores, entre otras patologías (28). La detección de células tumorales es posible debido a que su bioquímica, su comportamiento biológico y su estructura antigénica es diferente a las células no tumorales. El sistema inmunitario detecta y elimina periódicamente células pretumorales hasta que estas desarrollan mecanismos de evasión que permiten la supresión de la inmunidad provocando el crecimiento y, posiblemente, la metástasis de las células tumorales. Este proceso se llama inmunoedición (29). La presencia tumoral provoca infiltración de células inmunes, entre ellas los macrófagos asociados al tumor (TAM). Los TAM actúan como supresores tumorales eliminando células cancerosas y como potenciadores de progresión tumoral

mediante la producción de factores de crecimiento angiogénicos y linfangiogénicos, citoquinas y proteasas (30).

En la próstata predomina la inmunidad innata permitiendo condiciones prolongadas o crónicas de procesos hiperplásicos y neoplásicos. La inflamación crónica en un contexto de hiperplasia benigna prostática da lugar a un mayor engrosamiento de la próstata y a un peor pronóstico en sintomatología, lo que producirá mayor probabilidad de derivar en cáncer (31).

2.2. Vasos linfáticos

La vasculatura linfática forma una compleja red de vasos especializados en retornar fluido intersticial a la circulación sanguínea y mantener la homeostasis de fluidos en los tejidos (32). Los vasos linfáticos iniciales se caracterizan por mediar la absorción de fluidos y el tráfico celular (32,33) mediante las uniones intercelulares discontinuas de las células endoteliales, los bajos niveles de matriz extracelular y la falta de células murales (32). La linfa se transporta desde los vasos linfáticos iniciales hasta vasos linfáticos colectores pasando por nódulos linfáticos, los cuales presentan la linfa al sistema inmune para su control (32,33).

En un contexto tumoral y, más concretamente, metastático, los vasos linfáticos proporcionan a las células tumorales una ruta para invadir otros órganos (33,34). Este proceso es muy común en tumores sólidos. Aunque existen vasos linfáticos intratumorales, estos no son funcionales debido a que están sometidos a altas presiones. Son los vasos linfáticos peritumorales los que favorecen la diseminación (33), los cuales incrementan el número y tamaño favoreciendo la intravasación de células tumorales se (34). La formación de nichos pre-metastáticos en los nódulos linfáticos puede seleccionar células tumorales con mayor potencial de metástasis. Además, la afectación de los nódulos es un indicador de mal pronóstico. Existen diferentes factores de crecimiento que potencian la linfangiogénesis y la metástasis, entre ellos se encuentran *Vascular endothelium growth factor* (VEGF), *Platelet-derived growth factor* (PDGF)-B o IGF-1 (33,34). Se sabe que existe expresión de VEGF-C o VEGF-D en el tumor primario y en la metástasis de nódulos linfáticos en el cáncer de próstata, entre otros, y que correlaciona con un peor pronóstico (34–36).

2.3. Nervios

El sistema nervioso periférico es un circuito neuronal que conecta los órganos y las diferentes partes del cuerpo con el sistema nervioso central y el cerebro. Los órganos

internos están inervados principalmente por nervios simpáticos y parasimpáticos, ayudando a orquestar la homeostasis de los tejidos (37). Estos mismos sistemas nerviosos son los que interaccionan con el tumor y las células estromales, promoviendo la iniciación y la progresión de una gran variedad de tumores (38). En algunos cánceres como la próstata o el páncreas, se ha descrito que el incremento de densidad nerviosa va correlacionado con la agresividad del tumor (37–39). Además, también es un indicador de riesgo de recurrencia en dichos órganos (39). En estadios iniciales, el tumor activa vías de señalización que promueven el crecimiento y mantenimiento del sistema nervioso (axonogénesis) (38,39). La invasión tumoral puede facilitar la metástasis extendiéndose por el sistema nervioso central creando nichos pre-metastáticos (39).

2.4. Fibroblastos y fibroblastos asociados a cáncer

Los fibroblastos son células mesenquimales, también descritas comúnmente como células mesenquimales no-epiteliales, no-hematopoyéticas y no-endoteliales (40). Los fibroblastos sintetizan e integran proteínas estructurales como el colágeno o la elastina en la matriz extracelular (ECM) en muchos de los tejidos del cuerpo componiendo el estroma (40–42). Cambios en la composición de la ECM pueden estimular la fibrogénesis (41,42). Los fibroblastos se encuentran en estado quiescente hasta que se produce un daño en el tejido que solventan activando un fenotipo más contráctil llamado miofibroblastos (41,43). Los miofibroblastos son células mesenquimales con características estructurales y de marcaje de fibroblastos y de células musculares lisas. Este fenotipo también está presente en situaciones patológicas como fibrosis o tumores (41,43).

La heterogeneidad de los fibroblastos depende del estado de desarrollo, del origen del tejido o del microambiente del tejido (41–43). Dependiendo del sitio anatómico en el que se encuentren, los fibroblastos difieren en su origen derivando del mesodermo paraxial o del mesodermo de la placa lateral, a excepción de los fibroblastos craneofaciales que proceden de la cresta neural mesenquimal (42,43). Además, la identidad de los fibroblastos también se puede determinar por mecanismos intrínsecos como procesos epigenéticos, y/o extrínsecos como la señalización entre células o los elementos de la ECM (42). Debido a esta heterogeneidad, se sabe que no hay marcadores específicos para todos los tipos de fibroblastos, aunque es común usar PDGFR α o COL1A2 como marcadores universales (40–42). En muchos casos se identifican por la ausencia de marcadores endoteliales (CD31), epiteliales (EPCAM) o hematopoyéticos (CD45) (44). Los fibroblastos juegan diferentes roles en procesos

como la cicatrización de heridas, la fibrosis, el envejecimiento de tejido o el proceso tumoral (42,43).

En condiciones tumorales, los fibroblastos locales o residentes del tejido afectado dan lugar mayoritariamente a los fibroblastos asociados a cáncer o CAFs (aunque se cree que pueden tener otros orígenes como los pericitos, macrófagos, endoteliales, adipocitos o células madre mesenquimales) (41,44–46). Se pueden localizar dentro o adyacentes al tumor (46). Este cambio fenotípico a CAFs puede ser inducido por las células tumorales creando CAFs altamente proliferativos que tienen un rol importante tanto en la progresión como en la invasión tumoral (41,44,46). También puede deberse a cambios en la ECM, a estrés fisiológico y genómico o por diferentes vías de señalización, entre otros motivos (**Figura I 7**) (47). Una de las vías de señalización más influyentes en este cambio fenotípico es TGF- β 1 (41,43,44), que promueve la actividad de los factores de transcripción SMAD (*Mothers against decapentaplegic*) y SRF (47). Aunque también se ven afectados por WNT, PDGF y citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 o IL-6 (43). Para ayudar al tumor, los CAFs promueven funciones como la angiogénesis produciendo VEGFA, el desarrollo fibrótico de la matriz, modulando la infiltración inmunitaria, respondiendo a terapias o mediando en la metástasis (44,46,47). Aun sabiendo que promueven el crecimiento del tumor, hay estudios que sugieren un rol anti-tumoral inicial (46). Este grupo celular está muy bien descrito en algunos tumores como el adenocarcinoma pancreático o el cáncer de mama (44–46), donde se sabe que el estroma tumoral tiene una gran afectación desmoplástica provocando abundante tejido conectivo o fibrótico (46). También están bien definidos en melanoma, pulmón, glioblastoma y en tumores de cabeza y cuello (44). FAP, α SMA, DCN o PDPN son algunos de los marcadores expresados por subpoblaciones de CAFs en diversos tipos de cáncer (44,46).

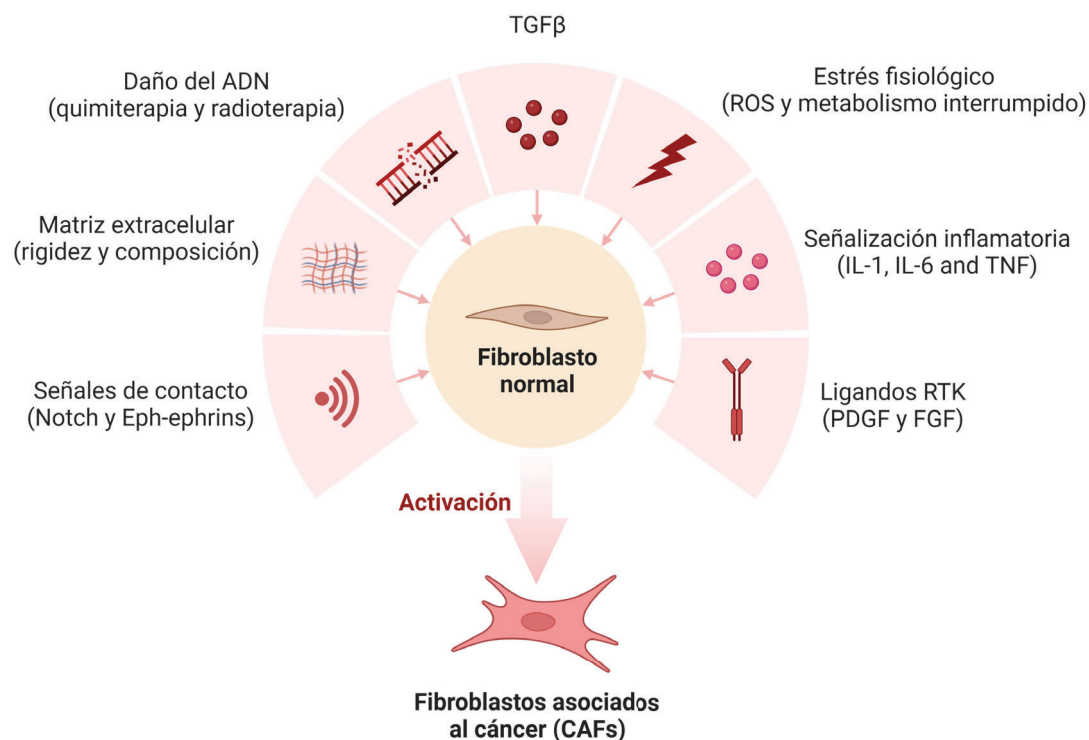


Figure I 7. Mecanismos que producen la activación de fibroblastos asociados al cáncer (CAFs)

Diseño basado en *Sahai E et al., 2020*.

Los CAFs en el cáncer de próstata no están tan bien descritos como en otros tumores, pero se sabe que la comunicación bidireccional entre CAFs y tumor tiene una importante repercusión en la progresión del cáncer. Los fibroblastos normales mantienen la homeostasis en la próstata (48,49). Se sabe que, al menos en modelos murinos, la expresión de AR es fundamental para mantener dicha homeostasis. En el estadio inicial de hiperplasia benigna, ya se encuentra un estroma reactivo similar al de la cicatrización (49). El origen de los CAFs en el PCa es mayoritariamente mediante activación de fibroblastos residentes, aunque se podrían dar otros orígenes (49). Los CAFs son una de las poblaciones estromales más abundantes. En situación tumoral, aunque no hay marcadores universales de CAFs (50), está descrita la pérdida de marcadores relacionados con las células musculares lisas (desmina, α SMA, calponina) y el incremento de genes asociados a CAFs (vimentina, PDGFR α/β , TGF- β 1/2, FSP1, CD90, CXCL12) (49,51,52). La pérdida de células que expresan α SMA en el estroma reactivo se vio apoyado por un estudio en muestras humanas de tumores prostáticos (53). La supervivencia de los miofibroblastos/CAFs se debe a la secreción de TGF- β por parte de las células epiteliales, la cual provoca que los miofibroblastos secreten también TGF- β creando una retroalimentación positiva (49).

2.5. Vasos sanguíneos

Existen dos procesos de formación de vasos sanguíneos: la vasculogénesis, que es el desarrollo de nuevos vasos a partir de células precursoras (angioblastos) en la embriogénesis, y la angiogénesis, (o neovascularización) que es la formación de vasos a partir de otros preexistentes (54–56). La maduración de la red vascular permite que los capilares se fusionen creando vasos más grandes (arterias y venas) (56).

El sistema vascular es fundamental para el desarrollo y la supervivencia. La estabilidad de los vasos sanguíneos para poder realizar estas funciones la permiten las células endoteliales y murales que los conforman (57).

2.5.1. Angiogénesis

El proceso de angiogénesis se puede llevar a cabo por cuatro mecanismos: brotación de angiogénesis, intususcepción (división de un vaso principal en varios más pequeños), ensanchamiento vascular y, la más común, incorporación de células endoteliales precursoras en las paredes de los vasos (55,58). Ante una estimulación angiogénica, las células endoteliales migran lejos del vaso existente siguiendo dicho estímulo e inician en ese punto el nuevo vaso sanguíneo (54). La vía de señalización mejor caracterizada en el desarrollo de la angiogénesis es la VEGF-A (55,56).

2.5.1.1. Angiogénesis tumoral

Los vasos sanguíneos tienen una gran importancia en la carcinogénesis y metástasis (9,55). Esta relación entre el tumor y los vasos sanguíneos se conoce desde el 1968 cuando se descubrieron una gran cantidad de factores pro-angiogénicos (10). En condiciones tumorales, las células endoteliales son irregulares y están desorganizadas y las células murales pierden adhesión con las endoteliales provocando la disfuncionalidad vascular (58). Estos cambios celulares de la vasculatura provocan que los vasos sanguíneos tumorales estén dilatados y sean irregulares, tortuosos y desorganizados (9,58,59). El sistema vascular tumoral es inmaduro y tiene menos células murales, lo que va asociado a una mayor permeabilidad, un incremento en hipoxia y en diseminación tumoral (59).

Los vasos sanguíneos permiten la oxigenación y nutrición del tumor, pero, a la vez, pueden ayudar a mejorar la respuesta de la radiación como tratamiento y a la distribución de la quimioterapia (9). Cuando el tumor crece más de unos milímetros, se dan condiciones de hipoxia (55,56,60) que provocan que las células tumorales produzcan factores angiogénicos para estimular la formación de nuevos vasos

sanguíneos que crecen invadiendo el tejido hacia el tumor (5,9,10). El proceso de hipoxia provoca la activación de HIF que, a su vez, induce la expresión de factores pro-angiogénicos como VEGF-A (55,56). De igual manera, el tumor también controla la vasculatura existente. Por tanto, acaba produciéndose una mezcla entre vasos existentes y nuevos (9). Existen muchos estudios que relacionan los niveles de factores angiogénicos con la agresividad tumoral (10).

Durante las últimas décadas, se han estudiados diferentes opciones terapéuticas para limitar el crecimiento vascular o normalizar los vasos sanguíneos existentes (61). La mayoría de las estrategias se centran en las células endoteliales ya que son el elemento central en la formación de vasos sanguíneos. Más recientemente, se ha identificado la importancia de las células murales, en particular los pericitos, en la formación y mantenimiento de los vasos orquestando el comportamiento de las células endoteliales (62,63).

En el cáncer de próstata, como en la mayoría de tumores sólidos, la angiogénesis es fundamental para el crecimiento y la progresión tumoral. Como se ha descrito anteriormente, VEGF-A es el mejor pro-angiogénico estudiado asociado a crecimiento tumoral, incluyendo en cáncer de próstata. La densidad microvascular es uno de los marcadores angiogénicos mejor establecidos, el cual correlaciona con el crecimiento tumoral, el valor de Gleason y la metástasis en el PCa (60,64).

2.5.2. Composición celular de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos están compuestos por células endoteliales y murales. Clásicamente, las células murales se dividen en células vasculares de músculo liso (vSMC) y pericitos. Los vasos sanguíneos pequeños están recubiertos por una monocapa discontinua de pericitos (62,65,66), mientras que los vasos grandes tienen diversas capas de vSMC (56). El mantenimiento de la cohesión entre células endoteliales y murales, entre ellas y con la membrana basal, es fundamental para evitar la excesiva permeabilidad y la filtración vascular (59).

2.5.2.1. Células endoteliales

Las células endoteliales forman una monocapa que reviste el lumen del vaso sanguíneo (54). Las células se mantienen quiescentes hasta que reciben estímulos pro-angiogénicos que las activen (56). El balance entre factores pro y anti-angiogénicos es el que mantiene el buen funcionamiento de las células endoteliales y, por consiguiente, del vaso sanguíneo (50).

El microambiente tumoral provoca el incremento de dichos factores pro-angiogénicos influenciando el fenotipo de las células endoteliales (50). Esto incluye alteraciones en las interacciones entre células endoteliales y pericitos que darán lugar a un sistema vascular defectuoso y aberrante (57).

2.5.2.2. *Células murales*

La diferenciación poblacional entre vSMC y pericitos por expresión de marcadores es muy compleja. Esta dificultad se debe a que ambas células comparten células progenitoras (67) y a las diferencias de expresión de genes que hay entre órganos y dentro del mismo órgano (68).

Las vSMC se colocan en capas concéntricas en la mayoría de arterias y venas (67,69,70), mientras que los pericitos se encuentran en vasos pequeños (arteriolas, vénulas y capilares) cubriéndolos parcialmente (67,70). El grado de cobertura de los pericitos sobre el endotelio varía dependiendo del tejido (70).

Las células murales tienen una importante función manteniendo la cohesión entre células endoteliales y membrana basal, controlando del diámetro y la presión vascular ya que tienen propiedades contráctiles y limitando la hiperpermeabilización y la filtración vascular (59).

2.5.2.2.1. *Células vasculares de músculo liso*

Las vSMC son células localizadas entorno a los vasos sanguíneos que tienen propiedades contráctiles. Sus funciones básicas son el mantenimiento de la estructura del vaso (67), la contracción y regulación del diámetro de los vasos sanguíneos, la presión sanguínea y la distribución del flujo de sangre (67,71,72). Cuando se encuentran diferenciadas tienen muy bajo ratio de proliferación y expresan, únicamente, proteínas contráctiles, canales de iones y moléculas necesarias para realizar su función contráctil (71,72).

La diferenciación de ambos fenotipos (vSMC diferenciadas/contráctiles y vSMC no-contráctiles) es complicada puesto que no se distinguen genes específicos y exclusivos de los fenotipos. Las vSMC contráctiles expresan proteínas relacionadas con la contractilidad como α SMA, SM-MHC, h1-calponin, SM22a, ACLP, desmina, h-caldesmon, meta-vinculina, telokina o smoothelina. Además, algunas de estas proteínas también son expresadas por otras células no-vSMC (67,69,71,72).

En el desarrollo de las vSMC participan diferentes vías de señalización como PDGF-BB y *Transforming growth factor- β* (TGF- β). Se cree que TGF- β 1 es crucial tanto para

la diferenciación de células madres embriónicas en vSMC como diferenciación en el fenotipo vSMC no-contráctil (67).

Las vSMC mantienen cierta plasticidad, aun estando diferenciadas, para actuar ante afectaciones en los vasos sanguíneos. En caso de daño vascular, por patología o vejez, las vSMC incrementan la proliferación, migración y capacidad de síntesis para reparar el vaso (67,71,72). Este fenotipo activo (vSMC no-contráctil), también se observa cuando se lleva a cabo la vasculogénesis y angiogénesis (67,71). En esta situación, las vSMC son importantes en producción de componentes de la matriz extracelular como colágeno, elastina o proteoglicanos (71). Un inconveniente de la plasticidad de las vSMC es su predisposición a cambiar de fenotipo contribuyendo al desarrollo y/o progresión de enfermedades vasculares, entre ellas las alteraciones vasculares que se dan en cáncer. En condiciones cancerosas, las vSMC se ven afectadas tanto morfológica como funcionalmente y esto, por ende, repercute en la funcionalidad del vaso sanguíneo (71).

2.5.2.2.2. *Pericitos*

Los pericitos fueron descubiertos y descritos por primera vez en el cerebro en el 1873 por Eberth y Rouget (73), aunque no fueron nombrados como pericitos hasta el 1923 por Zimmerman (74). Los pericitos participan en el desarrollo, la maduración y la remodelación de los vasos sanguíneos, además de controlar el flujo de sangre, la coagulación y la permeabilidad vascular (75). Como ya se ha mencionado, los pericitos rodean las células endoteliales pero la densidad varía según órganos: el cerebro tiene una ratio de 1:1-3:1 (endotelial:pericito), el músculo 100:1 (76), los riñones 1:2,5-1:17, el pulmón 1:10, el corazón 1:2-1:3 (77).

Los pericitos modulan directamente el comportamiento de las células endoteliales en el crecimiento vascular (63,78–81). En etapas iniciales del proceso angiogénico, los pericitos sufren reprogramaciones moleculares que provocan su diferenciación a un estado inmaduro que es permisivo con la progresión del ciclo celular y la migración. Durante este proceso de inmadurez, los pericitos permanecen en contacto con las células endoteliales, aunque no las cubren completamente (63,82).

Desde un punto de vista molecular, no hay un marcador que sea exclusivo para la identificación de pericitos (83–85), aunque existen algunos que pueden ayudar a identificarlos: PDGFR β , NG2, CD13, α SMA, desmina, calponina (57). Las nuevas técnicas de secuenciación del ARN de células individuales (*scRNAseq*) están ayudando a desvelar incógnitas en la identificación de posibles candidatos para la identificación (83–85).

La pérdida o disfuncionalidad de pericitos está vinculada a enfermedades graves como cáncer, infartos o fibrosis (83–85). En condiciones tumorales, se sabe que los vasos tienen una escasa cobertura de pericitos (86,87), esta disminución permite un incremento de la vasculatura tumoral, crecimiento tumoral (79,87) y desarrollo de metástasis (59,70,88). No está claro si la interacción defectuosa entre pericitos y células endoteliales en tumores se relaciona con la pérdida de los marcadores moleculares de identidad de pericitos (89), la transdiferenciación de pericitos a fibroblastos (90), el reclutamiento deficiente de pericitos (87) o una combinación de todos estos fenotipos. También se ha visto que la reprogramación metabólica de los pericitos tumorales se ve implicada en la contracción anormal de los vasos sanguíneos y demuestra un peor pronóstico (91). En glioblastomas y carcinomas renales se ha descrito una menor densidad de pericitos (75). En tumores de páncreas y colon con sobreexpresión de PDGFB se ha visto una reducción tumoral y un reclutamiento de pericitos en la vasculatura (92) (**Figura I 8**).

Se ha visto que los pericitos pueden promover la creación de nichos metastáticos al desengancharse de los vasos e incrementar la síntesis de ECM (93). Los pericitos en este nicho pueden encontrarse en menor cantidad y con pérdida total o parcial de interacciones con las células endoteliales, lo que produciría vasos inmaduros con alta permeabilidad (73). Aun así, el rol de los pericitos en los nichos metastáticos debe ser estudiado más en profundidad.

En situaciones metastáticas, hay estudios que muestran la falta de pericitos en la cobertura vascular promueve la diseminación de las células tumorales en carcinomas colorrectales humanos y en modelos de ratón con cáncer de páncreas (94,95). En un modelo de PCa se describió que el incremento de pericitos en la cobertura vascular reducía la frecuencia de invasión (96). En *Wong et al, 2020* se ha visto que existe una comunicación directa entre células tumorales y pericitos que puede afectar en el tamaño tumoral (97), también se ha visto que es esencial en la metástasis cerebral en melanoma y carcinoma pulmonar (98). La comunicación entre células tumorales y pericitos sigue siendo un campo bastante desconocido que necesita más líneas de investigación.

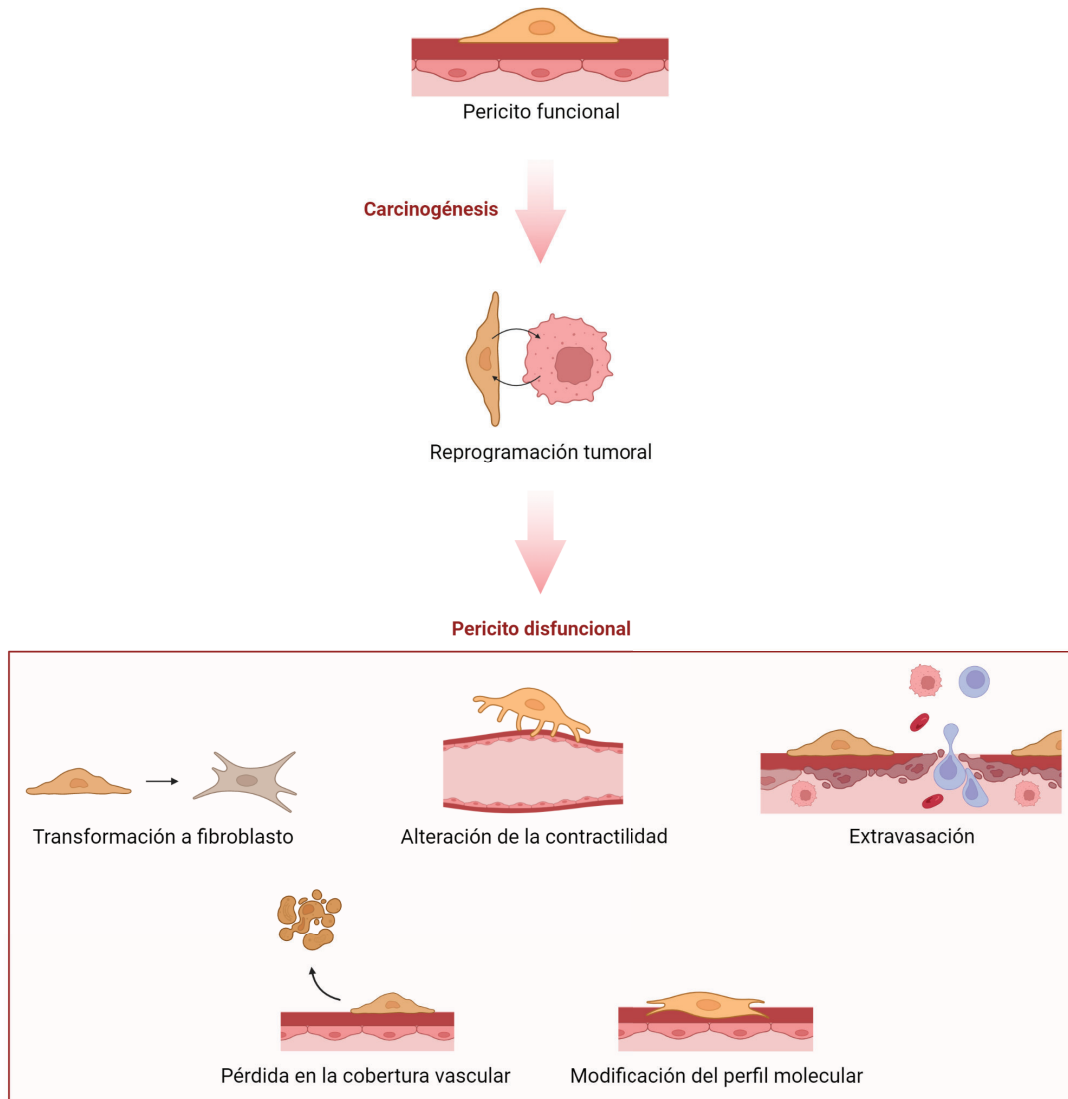


Figure I 8. Efectos de la carcinogénesis sobre los pericitos y sus funciones

3. La vía de señalización TGF- β

Transforming growth factor- β (TGF- β) es una vía de señalización multifuncional de citoquinas que regula procesos como el crecimiento y la diferenciación celular, la proliferación, la supervivencia, la muerte celular, la apoptosis y la respuesta inmune (99). La superfamilia de TGF- β incluye TGF- β , activinas, inhibinas, *Anti-Mullerian Hormone* (AMH), *Bone Morphogenic Protein* (BMPs), Growth Differentiation Factors (GDFs), Glial-derived Neurotrophic Factors (GDNFs) y nodos (100).

TGF- β es una proteína dimérica con 3 isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 (67,99). La isoforma TGF- β 1 interacciona como homodímero con un péptido latente formando una forma inactiva que se secreta a la ECM. Por el contrario, la activación de los

homodímeros TGF- β 2/3 o los heterodímeros no está muy bien descrita (99,100). También existen tres receptores de TGF- β : TGF- β RI, TGF- β RII y TGF- β RIII. TGF- β se une a hetero-tetrámeros de TGF- β RI/ TGF- β RII que contienen proteínas quinasa en el dominio citoplasmático. TGF- β RIII no tiene esta actividad quinasa, pero ayuda a incrementar la afinidad de unión con TGF- β RII (99).

Existen dos tipos de señalizaciones: (i) canónica mediante el conjunto TGF- β /SMAD y (ii) no canónica independiente de las SMADs (**Figura I 9**).

1. Señalización canónica dependiente de SMAD: TGF- β se une al complejo receptor TGF- β RI/ TGF- β RII provocando la fosforilación del TGF- β RI, el cual fosforilará los SMAD reguladores (SMAD2, SMAD3). El complejo fosforilado SMAD2/3 reclutará SMAD4 permitiendo la translocación del complejo al núcleo y la regulación de la transcripción de los genes. Tras la transcripción, el complejo SMAD2/3/4 sale del núcleo para mantenerse activo o degradarse por ubiquitinación. Alternativamente, la actividad de la vía se puede inhibir por SMAD6/7 uniéndose al ADN en el núcleo o bloqueando la interacción/fosforilación de SMAD2/3 (99,101).
2. Señalización no canónica independiente de SMAD: TGF- β se relaciona con factores como *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase* (PI3K)/AKT/mTOR, *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) o *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) entre otras vías de señalización (99,102).

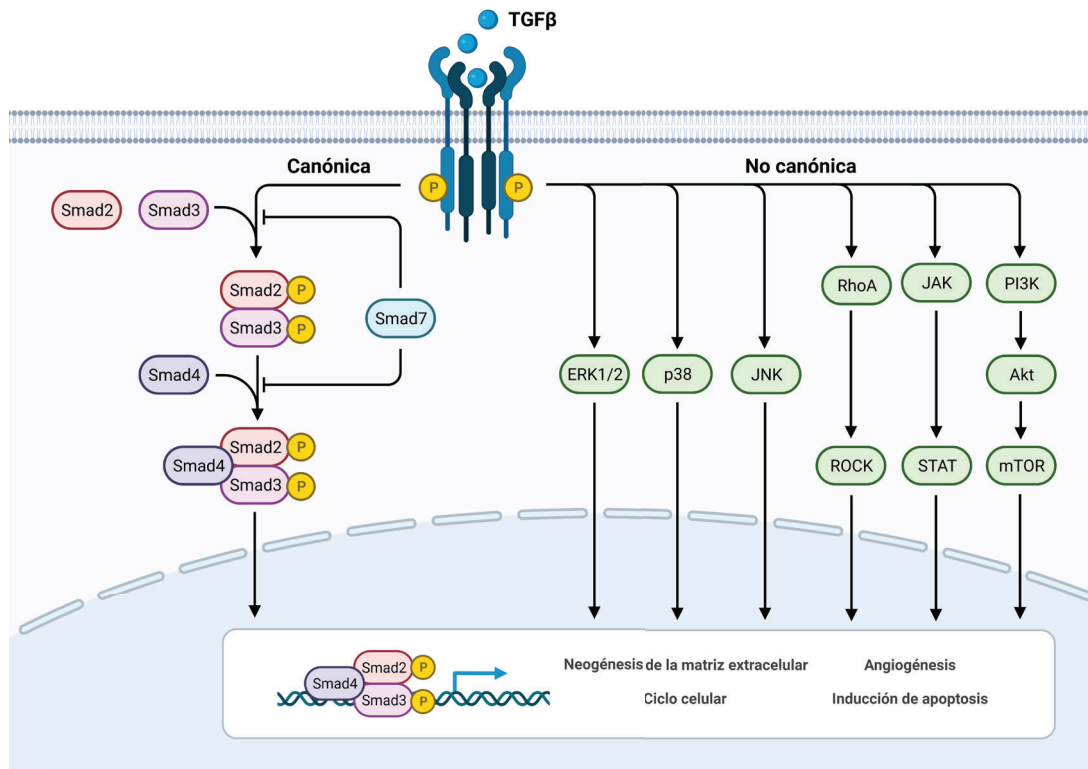


Figure I 9. Señalización canónica y no canónica de TGF-β

3.1. Señalización en cáncer

En estadios iniciales del desarrollo tumoral, TGF-β tiene un efecto supresor de la carcinogénesis regulando el crecimiento del epitelio normal y premaligno (99). En estadios avanzados, TGF-β mediante la vía canónica promueve la progresión tumoral regulando la TEM, entre otros procesos (10,103,104). Está muy bien descrita la vía de señalización TGF-β como estimulador de TEM y, por ende, de la metástasis en el cáncer (105).

Las células tumorales secretan TGF-β que a su vez induce factores de crecimiento pro-angiogénicos como VEGF para inducir la angiogénesis tumoral mediante la estimulación de las células endoteliales (99).

Existen estudios en pacientes con glioblastoma y cáncer de mama donde la alta expresión de TGF-β1 van asociados a un incremento en la progresión, mayor infiltración linfática y menor DFS (106,107). Hay ensayos clínicos donde se usa Galunisertib (inhibidor de TGF-β) como tratamiento (44) y se ha demostrado que la combinación de Galunisertib con quimioterapia mejora la supervivencia en estadios

avanzados de pacientes con cancer pancreático comparado con los tratados solo con quimioterapia (108).

3.2. Señalización en cáncer de próstata

Existen varios estudios antiguos (1992) que relacionan TGF- β 1 como biomarcador del cancer de próstata. Se asocia alta expresión de TGF- β 1 a malos pronósticos tanto en muestras murinas como humanas y en ensayos *in vitro* e *in vivo* (109,110). Se ha visto que en muestras benignas o hiperplásicas la expresión de TGF- β 1 se asocia a compartimentos estromales, mientras que en muestras tumorales se acumula en zonas cancerosas epiteliales. Además, se relacionó la expresión de TGF- β 1 de las células tumorales y los factores de crecimiento secretados por las células estromales debido a TGF- β 1 con la progresión tumoral (109,110). La detección de altos niveles de TGF- β 1 en muestras de PCa va asociado a angiogénesis, metástasis y mal pronóstico (64,111).

TGF- β está muy bien estudiada en la diferenciación de miofibroblastos y está muy sobre expresado por las células tumorales prostáticas (49,64). Desencadena un fenotipo de CAFs positivos para TGF- β R1/2 los cuales coordinan diferentes procesos fisiológicos como la remodelación de la ECM o la angiogénesis mediante vías de señalización dependientes e independientes de SMAD. También se sabe que esta vía de señalización sobre fibroblastos puede afectar a la malignidad del epitelio benigno (49).

La secreción de TGF- β por CAFs correlaciona positivamente con la progresión de cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) en humanos y en ratones. La secreción TGF- β autocrina por parte de los CAFs es crucial para la autorregulación, mientras que la paracrina permite la comunicación entre CAFs y el resto de células vecinas. Además, TGF- β es el punto central para regular las funciones de los CAFs y así promover el crecimiento tumoral, lo que se realiza mediante otras vías como PI3K/AKT, CXCL12, FGF o Wnt/ β -catenin (49).

La superfamilia de TGF- β tiene un papel importante en el microambiente óseo y su remodelación en cancer de próstata (18,24). Esta vía de señalización ayuda al desarrollo de la metástasis ósea en diferentes modelos animales estudiados y se sabe que la inhibición de TGF- β RI reduce la metástasis ósea (112)

3.3. Señalización en vasos sanguíneos y células murales

Se sabe que TGF- β puede estimular la angiogénesis, alterar el sistema inmune e inducir a las células estromales a secretar de factores de crecimiento y proteínas

asociadas a la matriz (113). TGF- β tiene importancia en el desarrollo de la vasculatura tanto en células endoteliales como murales (70). Células estromales sin señalización de TGF- β provocan la reducción de la masa tumoral y una ratio menor de angiogénesis (114).

TGF β -1 es una de las vías de señalización que promueve la expresión de marcadores de vSMC en ensayos *in vitro* incrementando marcadores como α SMA o SM-MHC. En algunos ensayos *in vivo* con ratones ApoE-/-, se mostró que TGF- β está envuelta en la producción de matriz en vSMC y en el desarrollo de placas fibróticas (71,115,116).

La inducción del fenotipo de las células murales no se conoce completamente, pero se cree que TGF- β puede ser una de las vías implicadas. Ensayos *in vitro* demuestran que la activación de TGF- β 1 (Alk5) provoca la fosforilación de Smad2/3 que regula la expresión de genes de vSMC como la SM22a o la fibronectina (70). Otros ensayos demuestran que TGF- β 1 induce a los fibroblastos quiescentes a expresar α SMA, reforzando la idea que esta vía de señalización tiene un efecto directo en la inducción del estroma reactivo (111). Se ha demostrado en riñones fibróticos que TGF- β 1 estimula la activación de los pericitos y su transición a miofibroblastos, tanto *in vitro* como *in vivo* (117).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer es una enfermedad multifactorial compleja que, durante años, se ha estudiado otorgando importancia únicamente a las células tumorales. El descubrimiento de otras células no malignas en los tumores, comúnmente llamadas como células estromales, abrió una nueva perspectiva al estudio del cáncer. Las células cancerosas reprograman las células estromales para promover el desarrollo del tumor, la invasión y la metástasis. Existen descripciones muy detalladas de cómo las células inmunes y los CAFs favorecen la progresión tumoral en diferentes tipos de cánceres. Otro proceso importante en el microambiente tumoral es la angiogénesis, la cual también se ha descrito detalladamente por su papel fundamental en el crecimiento del tumor y en la colonización de otros órganos. La mayoría de estudios sobre la angiogénesis se centran en el proceso *per se*, en la estructura global de los vasos sanguíneos o en la disfuncionalidad de las células endoteliales.

Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales y células murales, estas últimas tienen mucha importancia en el correcto funcionamiento de la angiogénesis, aunque en condiciones cancerosas es considerablemente desconocido. Las células murales son aquellas que se encuentran recubriendo los vasos sanguíneos y regulan su función. Existen dos tipos de células murales, las vSMC y los pericitos que se diferencian en el tipo de vaso que recubren, siendo los pericitos las células que recubren capilares, vénulas y arteriolas. Se ha descrito una cobertura de células murales escasa, en particular de pericitos, y la pérdida de adhesión entre endotelio y células murales en tumores. El motivo por el cual hay una pérdida de interacción entre pericitos y células endoteliales no es claro. Se ha propuesto que pudiera ser debido a una pérdida de los marcadores moleculares de identidad de pericitos, una transformación de fenotipo de pericitos a fibroblastos, o incluso a un reclutamiento deficiente de pericitos.

Mi tesis se centra en profundizar en los mecanismos que inducen una pérdida de función de los pericitos tumorales, utilizando el cáncer de próstata como modelo experimental. La hipótesis que planteo es que las células tumorales inducen un cambio de identidad en los pericitos que favorece la diseminación de las células tumorales. Para poder abordar mi hipótesis, planteo 4 objetivos principales:

Objetivo 1. Estudio y caracterización de los pericitos en próstatas murinas y humanas. Para describir detalladamente estas células, se usaron estrategias *in silico* (expresión de marcadores en bases de datos humanas) e *in vivo* (tinciones inmunofluorescentes en modelos de ratón).

Objetivo 2. Identificación y estudio de la vía de señalización que regula los cambios que produce el tumor en la cobertura vascular. Para resolver este objetivo se llevaron a cabo análisis *in silico* de un *scRNAseq* realizado previamente en el laboratorio, un *scRNAseq* de bases de datos públicas humanas y métodos *in vitro* (pericitos primarios aislados de cerebros murinos).

Objetivo 3. Estudio de la afectación tumoral sobre la funcionalidad de los pericitos y, por consiguiente, de los vasos sanguíneos. Los métodos utilizados para alcanzar este objetivo han sido ensayos *in vitro* (pericitos primarios aislados de cerebros murinos) e *in vivo* (tinciones inmunofluorescentes en modelos de ratón).

Objetivo 4. Generación y caracterización de modelo *in vitro* para el estudio de la recuperación tumoral tras tratamiento. Para llevar a cabo este objetivo, se hicieron ensayos de inhibición *in vitro* (pericitos primarios aislados de cerebros murinos sanos).

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Experimentación *in vivo*

1.1. Modelos de ratón

Para este proyecto se usaron diferentes modelos de ratón (*Mus musculus*) criados y mantenidos en dos centros de investigación diferentes: CIC bioGUNE en el País Vasco y CMCiB en Cataluña. Los animales fueron estabulados siguiendo la legislación y normativa establecidas por el Comité de bioseguridad y bienestar en CIC bioGUNE y por el Comité ético de experimentación animal en CMCiB.

En ambos casos, las condiciones de cría de los ratones se realizaron en jaulas ventiladas, en salas SPF libres de patógenos específicos, con ciclos de luz-oscuridad de 12h y temperaturas estables de 22°C para asegurar su bienestar, así como la fiabilidad de los resultados.

1.1.1. Modelos tumorales con *Probasin-Cre*

Los ratones usados fueron C57BL/6 genéticamente modificados de, al menos, cuarta generación.

El genoma de los ratones utilizados contiene secuencias loxP, las cuales están bajo el control de la Cre y, al activarse, permite la eliminación del fragmento de ADN localizado en medio (92). Los modelos tumorales se encuentran bajo el control de la *Probasin-Cre*, la cual tiene como función cortar las secuencias loxP que flanquean los genes de interés para provocar su pérdida (90,91). La expresión de la Cre, bajo el control del *Androgen-dependent ARR₂B probasin promoter (Pb-Cre4)*, permite la delección de los genes únicamente en las células epiteliales de la próstata y se activa durante la pubertad (2-meses de edad) (89) (**Figura M 1**). Los genes modificados en estos modelos fueron *Phosphatase and tensin homologue (Pten)* y/o *Liver kinase B1 (Lkb1)*, flanqueados por las secuencias loxP como se ha descrito anteriormente. Los modelos genéticos tenían pérdida parcial o total en uno o ambos genes.

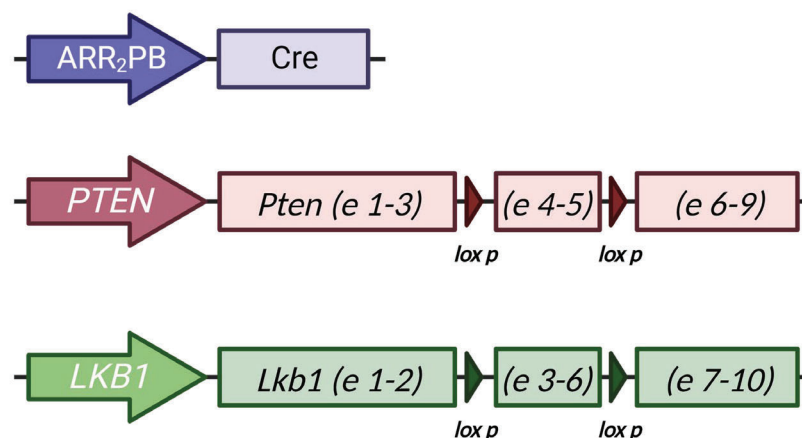


Figura M 1. Diseño genético de los modelos tumorales

Constructos genéticos de la Probasin-Cre (estructura superior), *Pten* flanqueado por secuencias loxP (estructura central) y *Lkb1* flanqueado por secuencias loxP (estructura inferior).

La formación del tumor empieza tras la activación de la Probasin-Cre, el desarrollo tumoral y la invasión serán diferentes dependiendo de la combinación de genes eliminados y del grado de la pérdida (**Tabla M 1**).

Tabla M 1. Modelos murinos

Línea murina	Pb-Cre-PTEN ^{WT/WT}	Pb-Cre-PTEN ^{flox/flox}	Pb-Cre-PTEN ^{flox/WT} ; LKB1 ^{flox/flox}
Grado de enfermedad	No tumoral (control)	Tumor no invasivo	Tumor metastático
Estado metastático	No	No	Sí

El mantenimiento, cuidado, manipulación y procesamiento de estos ratones se realizó en el centro CIC bioGUNE de Bilbao por miembros del laboratorio del Dr. Arkaitz Carracedo.

1.1.2. Modelos ortotópicos

Los modelos genéticos descritos previamente tienen como inconveniente el largo desarrollo temporal de los tumores. Es por ello que se decidió usar los modelos ortotópicos como alternativa para el estudio de los tumores de próstata.

La generación de los modelos ortotópicos se realizó mediante la inyección de las células tumorales en el lóbulo ventral de la próstata en ratones inmunodeficientes. La inyección se ejecutó mediante cirugía.

1.1.2.1. *Tumores ortotópicos procedentes de células DU145*

Los animales fueron tratados con el analgésico carprofen por inyección subcutánea 15 minutos antes de la cirugía. Después, fueron anestesiados con isoflurano. Una vez comprobado que los ratones están debidamente anestesiados, se inició la cirugía para la inoculación de células DU145 (células epiteliales humanas de cáncer de próstata (ATCC, HTB-81)). Primero, se realizó una incisión en la piel y el músculo localizados bajo el ombligo. Tras la abertura se localizó el lóbulo ventral bajo la vejiga y se inyectó la suspensión celular (DU145 EV GFP-Luc). Fueron inyectadas 2 millones de células por animal. Para confirmar que la inoculación se había ejecutado correctamente, se verificó si el lóbulo ventral se había hinchado debido al líquido inyectado. Finalmente, el músculo se cerró con puntos de sutura y la piel se grapó.

Los ratones fueron tratados con analgésicos diariamente durante tres días y las grapas se eliminaron dos semanas después de la cirugía. El seguimiento de los tumores se realizó mediante tecnología IVIS al tercer día tras la cirugía. La tecnología IVIS permite observar la bioluminiscencia *in vivo* (GFP) que expresan las células tumorales DU145 que han sido inyectadas. A continuación, una vez a la semana hasta que la señal alcanzó 10^{10} fotones de intensidad. Llegado este momento, los animales fueron sacrificados y los tumores extraídos.

El diseño, cuidado y procesamiento de estos ratones y muestras se realizó en el centro CIC bioGUNE de Bilbao por la Dra. Ianire Astobiza y la doctoranda Cristina Viera del laboratorio del Dr. Arkaitz Carracedo.

1.1.2.2. *Tumores ortotópicos procedentes de tumores Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}; LKB1^{flox/flox}*

Los animales de este modelo tumoral fueron procesados igual que los descritos en el apartado anterior, a excepción de las células inyectadas. La suspensión celular procedía de la digestión de tumores de próstata de ratones Pb-Cre-PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox}. La digestión se realizó con colagenasa II (Thermo Scientific, 17101-015) durante 1h a 37°C seguido de 3 min a 37°C con TryPLE (Gibco, 12563-011). Una vez finalizada, se inyectaron 6 millones de células por animal suspendidas en 50 ml de tampón fosfato salino 1X (PBS) y matrigel en proporción 2:1 (Corning, 354248).

El diseño, cuidado y procesamiento de estos ratones y muestras se realizó en el centro CIC bioGUNE de Bilbao por el Dr. Marco Piva del laboratorio del Dr. Arkaitz Carracedo.

1.2. Aislamiento de próstata

Llegados los seis meses de edad en los modelos tumorales o el momento óptimo de sacrificio en los ortotópicos, los ratones fueron eutanasiados mediante dislocación cervical bajo anestesia previa (isoflurano inhalado). Una vez eutanasiados se procedió a extraer rápidamente la próstata, ya fuese benigna o tumoral. Para ello se usó una lupa debido al pequeño tamaño de los lóbulos prostáticos, sobre todo en las muestras benignas. Para acceder a la próstata se abrió la cavidad abdominal y se apartó el aparato digestivo, ya que la próstata se encuentra localizada junto a la vejiga y al aparato reproductor. La próstata se divide en 3 lóbulos (**Figura M 2**) los cuales se extrajeron de manera independiente y en un orden concreto (ventral, dorso-lateral y anterior) para facilitar su obtención y procesamiento.

1.2.1. *Extracción del lóbulo ventral*

El lóbulo ventral se localiza bajo la vejiga. Es el lóbulo más pequeño, se encuentra rodeado de grasa, es prácticamente transparente a la vista y suele tener forma de mariposa. Se diferencia el lóbulo del tejido adiposo epididimal que lo rodea debido a que esta última tiene una textura esponjosa bajo la lupa que no comparte con la próstata.

Para la extracción, se levanta la vejiga y se limpia la grasa que rodea el lóbulo. Una vez limpio se disecciona desde la parte superior, más próxima a la vejiga, hasta la inferior.

1.2.2. *Extracción del lóbulo dorso-lateral*

El lóbulo dorso-lateral se encuentra rodeando la vejiga y la uretra llegando hasta la parte posterior de las vesículas seminales. Se pueden extraer ambas conjuntamente accediendo con cuidado por detrás de las vesículas, evitando romperlas para no contaminarlas con el contenido seminal.

La disección se inicia pinzando la parte dorsal del lóbulo para sujetarla y poder acceder a la zona superior, la más sencilla de corte. Después se continua la extracción hacia la zona lateral, evitando incidir en la uretra, hasta que toda la pieza queda liberada.

1.2.3. *Extracción del lóbulo anterior*

El lóbulo anterior es el más sencillo de visualizar y extraer ya que se encuentra unido a las vesículas seminales y, además, es el más grande de los tres.

Su extracción se inicia por el extremo no unido a la uretra, se sujeta el lóbulo anterior y se separa cuidadosamente de la vesícula seminal evitando romperla. Una vez se llega a la base, se disecciona separándola de la uretra.

El procesamiento de estas muestras se realizó en el centro CIC bioGUNE de Bilbao por el laboratorio del Dr. Arkaitz Carracedo. Posteriormente, se enviaron las muestras incluidas en parafina a Barcelona para ser analizadas.

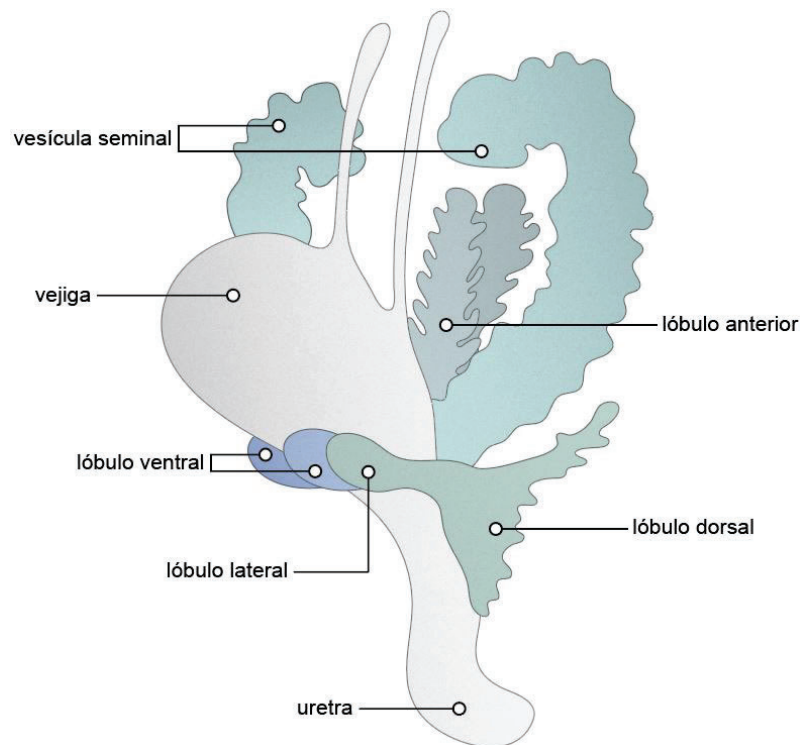


Figura M 2. Anatomía de próstata murina

Diseño basado en *Ittmann M., 2018*

1.3. Genotipado por PCR

Los ratones $\text{Pb-Cre-PTEN}^{\text{WT/WT}}$, $\text{Pb-Cre-PTEN}^{\text{flox/flox}}$ y $\text{Pb-Cre-PTEN}^{\text{flox/WT}}$; $\text{LKB1}^{\text{flox/flox}}$ se destetaron, marcaron y genotiparon a los 19 días. Durante el marcaje, se obtuvo una biopsia de cola de los ratones para realizar el genotipado. Las colas se incubaron 30 minutos a 95°C y 15 minutos a 4°C con 75 μl del tampón de lisis NaOH. Después se neutralizaron con 75 μl de tampón TrisHCl pH=5. Finalmente, se centrifugaron 1 minuto a máxima velocidad. Las colas digeridas se conservaron a 4°C hasta realizar el genotipado mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para genotipar estos modelos fueron necesarias 3 PCRs diferentes: Probasin-Cre, PTEN y LKB1. Las tres se realizaron con DreamTaq Green PCR MasterMix (Invitrogen

Ref. K1081). Para cada muestra se añadieron 5 μ l de MasterMix, 1 μ l de cebadores 5 μ M y 3 μ l de agua. Para la amplificación del ADN se mezclaron 9 μ l de solución madre con 1 μ l de ADN de la muestra y la reacción se llevó a cabo con las máquinas Matercycler. El ADN obtenido se separó mediante electroforesis usando geles de agarosa al 1.5% diluida en tampón TBE 1X (PanReac AppliChem, A4228). Siempre se añade un control positivo, un negativo y un blanco (sin ADN). Las secuencias de los cebadores, las temperaturas de hibridación y la longitud de los amplicones se describen en la **Tabla M 2**.

Tabla M 2. Cebadores para PCR

Genes	Secuencias (5' $\rightarrow$ 3')	Temp. de hibridación	Longitud del amplicón (pb)
CRE- FW	GGTGCAAGTTGAATAACCGGA	58°C	850 pb
CRE-RW	GGTATTGAAACTCCAGCGC		
LKB1-FW	GAGATGGGTACCAGGAGTTGGGGCT	65°C	Flox:300 pb WT: 220 pb
LKB1-RW	GGGCTTCCACCTGGTGCCAGCCTGT		
PCRS5 (extra para LKB1)	TCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGC		
PTEN-FW	TGTTTTTGACCAATTAAAGTAGGCTGTG	58°C	Flox:480 pb WT: 350 pb

1.4. Inclusión de muestras en parafina

Todos los lóbulos fueron introducidos en *cassettes* para biopsias y fijados en formalina durante 24h a 4°C. Después de retirar la formalina, se lavaron con PBS 1X durante 20 minutos en agitación, se sumergieron en etanol 50% durante 20 minutos y, finalmente, se mantuvieron en etanol 70% a 4°C hasta ser procesadas en un inductor automático.

El inductor realizó una etapa de deshidratación, otra de sustitución de alcoholes por xilenos y, para acabar, una sustitución de xileno por parafina. La deshidratación estuvo compuesta por diferentes purezas de etanoles (50%, 70%, 80%, 96% y 3 veces al 100%) durante 1h y media cada uno. Seguidamente, los *cassettes* se sumergieron 45 minutos en xileno una vez y dos veces en parafina durante 2h.

Al acabar, los *cassettes* se trasladaron a la máquina de inclusión de parafina para hacer los bloques. Para ello se colocaron los diferentes lóbulos orientados y ordenados (anterior, ventral y dorsolateral) juntos en el mismo *cassette*, si el tamaño de los tumores

lo permite. Después se rellenaron los *cassettes* con parafina y se solidificaron en una placa fría. Una vez sólidos los bloques, se conservaron a temperatura ambiente.

1.5. Secciones de tejidos en parafina

Las secciones de los bloques se realizaron con un micrótopo. Los bloques fueron colocados previamente un minuto en una placa fría para endurecerlos y así facilitar el corte. Las secciones se hicieron a 5 μm y se colocaron en un baño de agua a 40°C para facilitar la adhesión de la parafina en el portaobjetos. Estos se mantuvieron a 37°C durante una noche y, posteriormente, se guardaron a temperatura ambiente.

1.6. Biopsias humanas

Las muestras humanas usadas en este proyecto proceden del Biobanco Vasco para investigación del hospital de Basurto en Bilbao bajo consentimiento informado y con la evaluación y aprobación del comité de ética correspondiente (código CEIC OHEUN11-12 OHEUN 14-14). La cohorte incluía biopsias de diferentes estadios de cáncer de próstata (**Tabla R 1**) que tienen un seguimiento aproximado de unos 8 años. Las muestras se recibieron directamente en secciones de parafina que fueron mantenidos a temperatura ambiente.

1.7. Tinción de próstatas por inmunofluorescencia

El proceso de tinción se inició con la desparafinación de las muestras, sumergiéndolas en xileno (4 veces durante 5 minutos cada una) y etanol a diferentes purzas: 100% dos veces durante 3 minutos, 96%, 70% y 50%, una vez durante dos minutos cada uno. Finalmente, se rehidrataron con agua dos veces durante 5 minutos. Tras eliminar la parafina, se realizó una recuperación antigénica hirviendo las muestras 10 minutos en un tampón de citrato a pH=6. Luego se enfriaron 20 minutos, se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos, se permeabilizaron 15 minutos por dos veces con 0.2% PBS-tween (Sigma, P1379-500ML) 20 y se lavaron tres veces con PBS 1X durante 5 minutos cada vez. A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas durante 30 minutos en solución de bloqueo compuesta por PBS 1X al 2% de BSA y 10% de suero de caballo. Seguidamente, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario O/N a 4°C en cámara húmeda (**Tabla M 3**). Al día siguiente, se hicieron tres lavados con PBS 1X durante 5 minutos cada vez y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente en la cámara húmeda protegidas de la luz (**Tabla M 4**). Para acabar, tras tres lavados de PBS 1X de 5 minutos, se incubaron las muestras con DAPI (Thermo Fisher, D1306) durante 5 minutos. Finalmente, se montaron con

Shandon™ Immu-mount™ (Thermo scientific, 10622689), se secaron O/N a temperatura ambiente y se conservaron a 4°C hasta ser observadas al microscopio y analizadas.

Tabla M 3. Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Especie	Dilución	Compañía y referencia
CD31	Rabbit	1/50	Abcam, ab28364
DES	Rabbit	1/50	Abcam, ab15200
DES	Goat	1/100	R&D System, AF3844-SP
MYH11	Rabbit	1/50	Abcam, ab224804
Ter119	Rat	1/50	R&D sustems, MAB1125

Tabla M 4. Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia

Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía y referencia
Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488®	1/200	Invitrogen, A11008
Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 568®	1/200	Invitrogen, A11011
Monkey anti-Rabbit Alexa Fluor 647®	1/200	Life technologies, A31573
Monkey anti-Goat Alexa Fluor 488®	1/200	Invitrogen, A11055
Monkey anti-Goat Alexa Fluor 568®	1/200	Life technologies, A11057
Monkey anti-Rat Alexa Fluor 488®	1/200	Invitrogen, 21208
Mouse anti-Actin, α -Smooth Muscle - Cy3™	1/200	Sigma, C6198

1.8. Microscopia electrónica

Las muestras de próstata usadas para la microscopía electrónica tienen un procesamiento específico, distinto a las muestras incluidas en parafina. Esta técnica requiere tejido fresco, el cual se troceó en cubos de aproximadamente 1x1 milímetros. Los cubos fueron fijados en Glutaraldehído 2,5% (diluido en tampón de Cacodilato 0.1M a pH=7,1-7,4) durante 2h a 4°C y, después, se lavaron 3 veces con Cacodilato durante 15 minutos. Tras la primera fijación, se realizó una segunda con Tetraóxido de osmio 1% (diluido en el tampón de Cacodilato) durante 2h a temperatura ambiente. Este tampón permite la fijación lipídica y provoca un contraste negro en la muestra. Transcurridas las dos horas, se lavaron las muestras con Cacodilato tres veces durante 15 minutos cada una. Las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación que incluye un gradiente de etanol en diferentes purezas (30% y 50% durante 15 minutos, 70% durante 20 minutos, 70% durante 25 minutos u O/N, dos veces al 90%, dos veces al 96% y dos veces al

100% todas ellas durante 30 minutos) y dos veces óxido de propileno durante 30 minutos. Tras eliminar los alcoholes, se inició un proceso de inclusión en resina EPOXY (11,9 ml resina, 8 ml DDSA, 5,75 ml NMA y 0,4 ml DMP-30) siguiendo diferentes proporciones: una hora de óxido de propileno/Resina EPOXY 3:1, una hora de 2:2, ON de 1:3 y dos veces en Resina EPOXY pura durante 2h y 1h. Una vez incluidas las muestras en resina, se encapsularon en los bloques orientando la muestra adecuadamente. La polimerización de los bloques se realizó durante 48h a 60°C y se conservaron a temperatura ambiente hasta procesar las muestras.

El área de observación se seleccionó realizando cortes semifinos los cuales tenían un grosor entre 250 y 300 nanómetros (nm). Las muestras se cortaron con un ultramicrotomo (Leica EM UC6) usando una cuchilla de diamante (DIATOME ultra 45°). Los cortes se secaron a 40°C, se tiñeron con azul de Toluidina durante 2 minutos a 40°C y se lavaron con agua. Estos cortes fueron observados en un microscopio y permitieron ajustar la zona de interés.

Una vez elegida el área de estudio se realizaron cortes ultrafinos de 80 nm. Para los cortes ultrafinos también se usó cuchilla de diamante, luego se conservaron en rejillas en lugar de portaobjetos. Las muestras se contrastaron antes de ser observadas, para ello se las sometió a una tinción de 12 minutos de acetato de uranilo, seguido de un lavado con agua. Se finalizó el contraste con citrato de plomo durante 3 minutos, un lavado con agua y un secado de 24h. De cada muestra se obtuvieron 3 rejillas a diferentes profundidades.

La adquisición de las imágenes se realizó con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 80kW y una cámara Gatan ES500W. Las imágenes se obtuvieron a 8000 aumentos.

Las muestras de próstata se obtuvieron en el centro CIC bioGUNE de Bilbao por el Dr. Marco Piva del laboratorio del Dr. Arkaitz Carracedo. El procesamiento de los tejidos e imágenes de TEM se realizaron en la plataforma de microscopia electrónica en el Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) por la especialista Cristina Pardo.

1.9. Microscopia Confocal

Las imágenes de próstata se obtuvieron con el Confocal invertido Leica SP5 en la plataforma de microscopia de IDIBELL. Fueron tomadas y cuantificadas 5 imágenes aleatorias por cada muestra teñida. Las imágenes para el análisis de la cobertura

vascular de DES, α SMA y MYH11 fueron tomadas a 40X, en cambio, el resto de análisis fueron hechos a 20X.

1.10. Cuantificaciones estromales de la próstata de ratón y humana

Las cuantificaciones se hicieron con el software Image J (versión 1.52a). El montaje final se realizó con Adobe Photoshop 2021 y Adobe Illustrator 2021.

1.10.1. *Estructuras vasculares*

El recuento de vasos sanguíneos se hizo manualmente identificando las estructuras vasculares mediante el marcaje de CD31 (*PECAM1*). El resultado final es la media por muestra y genotipo.

1.10.2. *Área luminal de los vasos sanguíneos*

Se usaron las mismas imágenes que en la cuantificación de vasos para conocer el área luminal de estos. El tamaño del lumen se midió manualmente midiendo el espacio interior del marcaje de CD31 (*PECAM1*). El resultado final es la media por muestra y genotipo.

1.10.3. *Área positiva para CD31, DES y α SMA*

Las imágenes tomadas a 20X también fueron usadas para cuantificar la expresión total de CD31 (*PECAM1*), DES y α SMA (*ACTA2*) en el tejido. Para estos análisis se aplicó *threshold* en el ImageJ y se obtuvo una selección de toda el área positiva de marcador. El valor de área cuantificado se normalizó por el área total de tejido en cada imagen para representarlo en porcentajes. El resultado final es el porcentaje medio por muestra y genotipo.

1.10.4. *Área de cobertura vascular positiva para DES, α SMA y MYH11*

El análisis de cobertura vascular se hizo con imágenes a 40X. Usando el marcaje de CD31 (*PECAM1*) como referencia para medir manualmente la cobertura del vaso se obtuvo el área de cobertura. Después se realizó *threshold* de DES, α SMA (*ACTA2*) y MYH11 dentro de dicha área de cobertura. La expresión del marcador se normalizó por el área de cobertura del propio vaso sanguíneo, obteniendo un porcentaje de cobertura por vaso. El resultado final es el porcentaje medio por muestra y genotipo.

1.10.5. *Área de eritrocitos extravasados*

La extravasación de eritrocitos se cuantificó con el marcador de eritrocitos Ter119. Para cuantificar únicamente la expresión fuera del vaso, se localizaron los vasos sanguíneos con el marcaje CD31 (*PECAM1*) y se seleccionó el área del lumen del vaso para eliminar la expresión del marcador Ter119 en esa zona. Una vez eliminada la tinción intravascular, se aplicó el *threshold* en ImageJ para obtener el área positiva de Ter119. El valor de área extravasada se normalizó por el área total de tejido en cada imagen para representarlo en porcentajes. El resultado final es el porcentaje medio por muestra y genotipo.

1.10.6. *Presencia o ausencia de pericitos (Microscopia electrónica)*

La presencia de pericitos en la cobertura vascular se cuantificó teniendo en cuenta dos datos: determinando si existe o no cobertura vascular e identificando la célula de cobertura como pericito u otra célula mural. Considerando esta información, se normalizó el número de vasos con y sin cobertura por el número de vasos total. El resultado final es el porcentaje medio por muestra y genotipo.

2. Experimentación *in vitro*

2.1. Aislamiento, digestión y selección de pericitos de cerebro de ratón

El aislamiento de pericitos de cerebro se realizó con ratones de 3-4 semanas de edad. Tras eutanasiarlos por dislocación cervical, se extrajo inmediatamente el cerebro descartando el bulbo olfatorio, el cerebelo y la medula. El resto se mantuvo en medio de sales equilibradas de Hanks (GIBCO, 14170-112) con antibióticos (Penicilina/estreptomicina) hasta ser procesados. Debido a la reducida cantidad de pericitos, se recolectaron entre 4 y 6 cerebros por aislamiento.

Los cerebros fueron troceados manualmente con una cuchilla y digeridos con una solución de digestión basada en papaína (Worthington Papain Dissociation System, LK003150) durante 70 minutos a 37°C en movimiento constante. Tras la incubación, el tejido fue homogeneizado 10 veces pasándolo por una aguja de 19G hasta obtener una solución líquida y blanquecina. Las células de cerebro homogeneizadas fueron mezcladas con 1,7 volúmenes de BSA al 22% en PBS 1X y centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos. Después de centrifugar, se eliminó cuidadosamente la mielina (capa aislante localizada entorno a los nervios compuesta por proteína y lípidos) que aparece en la superficie. El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de medio Eagle modificado de Dubecco (DMEM) (GIBCO, 41965-039) y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos.

Las células resultantes fueron resuspendidas en medio de crecimiento de células endoteliales (EGM2) (Lonza, CC-3124) y sembradas en placas de 24 pocillos recubiertas con colágeno 0.02% (Corning, 45354249) al menos 2h.

Después de 20h, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X y se les añadió EGM2 fresco. El medio se cambió cada 2-3 días según la confluencia de las células. Durante los dos primeros pases, las células se mantuvieron en EGM2. A partir del tercer pase se inició la selección de pericitos, las células se cultivaron con medio de pericitos compuesto por DMEM con suero fetal bovino al 2% y suplementos para el crecimiento de pericitos (Science cell, 1252) (**Figura M 3A**).

Los pericitos fueron caracterizados a partir del sexto pase. Se observó la morfología (**Figura M 3B**) y la expresión proteica de marcadores de pericitos (**Figura R 24**). Para la caracterización proteica se usaron como control células endoteliales aisladas de pulmones murinos.

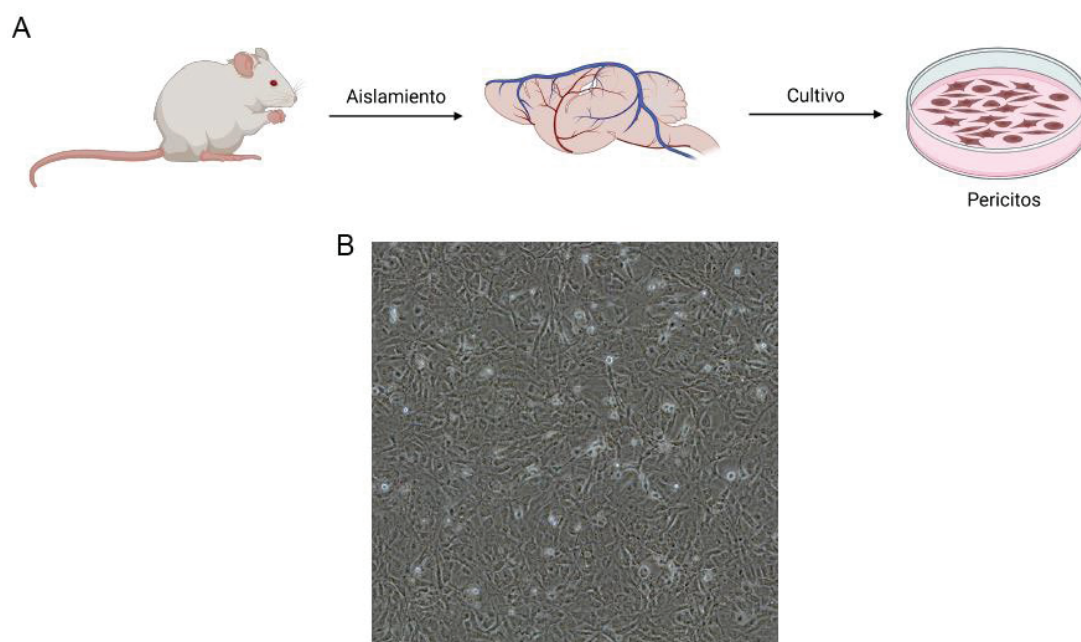


Figura M 3. Aislamiento primario de pericitos murinos

(A) Representación esquemática del proceso de aislamiento y cultivo de pericitos de cerebro de ratón.
(B) Imagen representativa de la morfología de pericitos en cultivo.

2.2. Tratamiento farmacológico

En los ensayos farmacológicos se usaron pericitos de cerebro de ratón aislados como se ha descrito previamente.

2.2.1. Activación de TGF- β

Para realizar el tratamiento con TGF- β 1 (Recombinant Human TGF- β 1 (HEK293 derived) (Preprotech, 167100-21-B), se sembraron 125.000 pericitos por pocillo en placas de 6 pocillos recubiertas con colágeno usando medio de pericitos. Al día siguiente se descartó el medio y se trataron los pericitos con vehículo o 5 μ g/ml de TGF- β 1, ambos diluidos en medio de pericitos. Se congelaron las placas a tiempo 0h, 24h y 48h. De cada condición se sembraron dos pocillos como replicados técnicos.

2.2.2. Inhibición de TGF- β -R

Para realizar el ensayo con el inhibidor, se sembraron 175.000 pericitos por pocillo en placas de 6 pocillos recubiertas con colágeno. Al día siguiente se descartó el medio y se trataron los pericitos con TGF- β 1 e inhibidor de Smad3 (Calbiochem, 566405) Tratamiento e inhibidor tenían sus vehículos independientes, las concentraciones usadas fueron 5 μ g/ml de TGF- β 1 y 3mM de inhibidor de Smad3 y ambos fueron diluidos en medio de pericitos. Se congelaron las placas a tiempo 0h y 24h. De cada condición se sembraron dos pocillos como replicados técnicos.

2.3. Extracción de ARN, síntesis de cADN y qPCR

El lisado de pericitos para la obtención de ARN se hizo a partir de placas de 6 pocillos usando el kit Maxwell® RSC simplyRNA cells Kit (Promega, AS1390). Se usaron 1000ng de ARN para hacer una transcripción reversa y, por tanto, obtener cADN. Para la qPCR, se usó el sistema LightCycler 480 con el kit LightCycler 480 SYBR Green I Master y los cebadores específicos detallados en la **Tabla M 5**.

Tabla M 5. Cebadores para qPCR

Genes	Secuencias	Genes	Secuencias
ACTA1-FW	ATGCTTCTAGGCGCACTCGC	FSP1-RV	GCAGCCCTCAAAGAATTCATTGCAC
ACTA1-RV	CCCTGCAACCACAGCACGAT	mL32-FW	ACCCCAGAGGCATTGACAAC
ACTA2-FW	ACTGGTATTGTGCTGGACTCTGGAG	mL32-RV	ATTGTGGACCAGGAACCTTGC
ACTA2-RV	CATGAGGTAGTCGGTGAGATCTCGG	MYH11-FW	CAAGAGCTGCTCCAAGAAGAAACCC
ANPEP-FW	CATGGAAGGAGGCGTCAAGAAAGTG	MYH11-RV	TTGCTTAGCCTCCATCTCCTCATCC
ANPEP-RV	CCTTCATGGCTGGCTCATCAAAACA	NG2-FW	GCAGGATGGCTGTCTGATCAAACCTG
CD248-FW	GTTGGTGGCTTTGAGTGTTACTGCA	NG2-RV	TCCTTCCCCTCATGTCTCCGTAAC
CD248-RV	CCTCCCCTTCTTCTCCATCATCCAG	PDGFR β -FW	TCTGCCTGAAGTGTGTACCTACCAC
CTHRC1-FW	TCCTGCCGACCCCTTTACCT	PDGFR β -RV	TGGTCCCAGAGAGAACAAGGAAAG
CTHRC1-RV	GCTGATCGGTGCGGACAACCT	RGS5-FW	GGAAAGGGCCAAGGAGATCAAGAT
DES-FW	TCAGACTTGACTCAGGCAGCCAATA	RGS5-RV	GGCTTCTCTGGCTTCTCATTGTATGG
DES-RV	AATCTCGCAGGTGTAGGACTGGATC	Twist-FW	CCCAGCGGGTCATGGCTAAC
FAP-FW	GTCCAGTGAACGAGTATGCTTGCAAG	Twist-RV	AAGTCGATGTACCTGGCCGC
FAP-RV	CAGCCCATCCTGTTCTGCTTTCTTC	Vim-FW	ACCGGAACAACGATGCCCTG
FSP1-FW	TGATGAGCAACTTGGACAGCAACAG	Vim-RV	ATCTCACGCATCTGGCGCTC

2.4. Extracción de proteína y *western blot*

El lisado de pericitos se obtuvo añadiendo 80 μ l de tampón de lisado de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Millipore, 20-188) con MgCl₂ y Benzonasa (Millipore, E1014-5KU). Después las muestras fueron mezcladas con vórtex mantenidas 10 minutos en hielo y centrifugadas 15 min a 4°C a máxima velocidad. El sobrenadante se traspasó a un eppendorf limpio y se cuantificó la cantidad de proteína mediante la curva de BCA (PIERCE, 23225). La proteína fue mezclada con el tampón de carga Laemmli azul (BIO-RAD, 1610747) y desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos.

La separación proteica se hizo con geles comerciales (NuPAGE™ 4 a 12 %, Bis-Tris de 1,0 mm) (Invitrogen, WG1403BOX). Siempre se usa un control de carga con pesos conocidos junto con el resto de muestras. La electroforesis se realizó a 150V hasta que las muestras pasaron el frente del gel, luego se aumentó a 180V durante 1h y media. Al acabar, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante una técnica húmeda usando tampón de transferencia a 100V durante 1h y media. La membrana se lavó con agua antes y después de visualizar las bandas proteicas con Ponceau (Sigma, P3504) lo que nos permitió cortar la membrana en los pesos moleculares de interés.

Una vez cortadas las membranas, se hicieron dos lavados con tapón salino con tris (Tris: Sigma, A2264; NaCl: Merck, 1064041000; KCl: Merck, 1049361000) y Tween 20 (Sigma, P1379) (TBST) de 5 minutos, se bloquearon con TBST con 5% de leche (Nestlé Sveltesse deshidratada) y se eliminó el exceso de leche con tres lavados de TBST durante 10 minutos cada uno. Las membranas se incubaron O/N a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en TBST al 0,002% de azida (Sigma, 71289) (**Table M 6**). Al día siguiente, se lavaron tres veces con TBST durante 10 minutos cada vez y se incubaron durante 2h con los anticuerpos secundarios diluidos en TBST con 5% de leche (**Table M 7**).

Se realizaron tres lavados de TBST de 10 minutos cada uno antes de revelar las proteínas. Para el revelado se usaron dos soluciones: (A) Tris 1M pH=8,5 (Sigma, T6066), ácido cumárico 90mM (Sigma, C9008) y luminol 500mM (Sigma, A8511) en base de agua; y (B) agua al 10% de agua oxigenada 30% (Sigma, H1009). Estas soluciones se mezclaron (1000:3) y se incubaron las membranas con el revelador durante 1 minuto. Finalmente, se revelaron las membranas mediante una máquina de adquisición de imágenes de *western blot*.

Tabla M 6. Anticuerpos primarios para *western blot*

Anticuerpo primario	Especie	Dilución	Peso molecular (kDa)	Compañía y referencia
β -actin	Mouse	1/1000	42	Sigma, A5441
DES	Rabbit	1/1000	52	Abcam, ab15200
pSMAD3	Mouse	1/1000	52	Cell Signaling, 9520

Tabla M 7. Anticuerpos secundarios para *western blot*

Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía y referencia
Goat anti-rabbit HRP	767011	Promega, W401B
Goat anti-mouse HRP	767011	Promega, W4021

3. Experimentación *in silico*

3.1. CancerTool

CancerTool es una plataforma de análisis genómico que permite obtener correlaciones básicas y análisis de enriquecimiento entre genes (<http://genomics.cicbiogune.es/CANCERTOOL/>). Incluye bases de datos de 4 tumores diferentes: pulmón, mama, colon y próstata. De esta última hay 7 bases de datos, 5 de las cuales contienen tejidos normales, tumor primario y metástasis (Grasso, Lapointe, Taylor, Tomlins, Varambally); y 3 de ellas incluyen el seguimiento clínico y datos de recurrencia (Glinsky, Taylor, TCGA).

El uso de esta plataforma nos permitió obtener datos sobre la expresión de genes en los diferentes estadios del cáncer de próstata y los datos de supervivencia libres de enfermedad.

3.1.1. *Análisis bioinformático de correlación positiva con desmina*

Utilizando la información que proporcionan las bases de datos incluidas en el CancerTool, se decidió hacer un análisis enriquecido sobre desmina. Para ello se utilizaron los datos sobre correlación y supervivencia libre de enfermedad (*Disease-free survival*, DFS).

Para saber que genes tenían un mismo patrón de expresión que desmina, se usaron las bases de datos Glinsky, Grasso, Taylor, TCGA y Varambally. Se seleccionaron los genes que aparecían, como mínimo, en tres de las cinco bases de datos y, además, eran significativos en al menos dos de ellas. En paralelo, se realizó el mismo análisis con los datos de DFS usando Glinsky, Taylor, TCGA y Varambally. En este caso los genes tenían que aparecer y ser significativos en al menos dos bases de datos y tener 100% de consistencia en cuanto a direccionalidad del poder pronóstico. Posteriormente, se comprobaron los genes comunes entre el análisis de expresión y de DFS respecto a desmina y se obtuvo la lista final de genes. Para acabar, se analizaron las funciones biológicas relacionadas con la lista final.

Los análisis bioinformáticos realizados con el CancerTool fueron hechos por la Dra. Natalia Martín del laboratorio del Dr. Arkaitz Carracedo.

3.2. Análisis de próstatas por secuenciación de células individuales (*scRNAseq*)

Se usó un análisis de *scRNAseq* que se realizó y analizó previamente en el laboratorio (datos no publicados). El procesado fue hecho por el doctorando Hielke van Splunder y el análisis bioinformático por la doctoranda Ane M. Larrinaga. Se procesaron tres muestras control y tres tumores indolentes (PTEN^{flor/WT};LKB1^{flor/flor}) de ratón de las cuales se identificaron los diferentes grupos celulares mediante marcadores canónicos.

Las muestras secuenciadas se procesaron con *CellRanger* para obtener la *CountMatrix*. El preprocesado de los datos se hizo mediante Seurat, al igual que la integración de las muestras. Todo ello se ejecutó con el software R version 4.2.2 (2022-10-31).

3.2.1. Análisis de ligando-receptor

Este análisis se basa en la probabilidad de comunicación entre 2 células basándose en la expresión de ARN. Para realizarlo se usó la librería *CellChat* (118). Se hicieron análisis separados entre las muestras control y las tumorales.

Usando la librería *tidyverse* (119) se filtraron las células murales como único grupo receptor de las interacciones. Después se estudiaron las vías de señalización que interaccionaban y la frecuencia de dicha interacción con las células murales. Para crear el gráfico de barras se usó la librería *ggplot* (120).

3.2.2. Análisis de fenotipo de respuesta a la señalización de TGF- β

La firma que determina un fenotipo de activación por TGF- β se obtuvo del artículo *Calon et al. 2015*. Tras conseguirla, se usó la librería *AUCell* (121) para analizar la expresión de dicha firma en los diferentes grupos celulares. Para no introducir ruido en el análisis, se seleccionaron los genes comunes del *scRNAseq* y de la firma y se trabajó únicamente con esos. La librería *AUCell* establece un valor de activación que es filtrado por aquella distribución que se ajuste mejor al area bajo la curva de la distribución de los datos. Esta curva indica si la célula presenta el fenotipo o no. Para crear el gráfico, se realizó una clasificación extra en la que diferenciábamos el fenotipo (activado o no por TGF- β) por condición (control o tumor). A partir de estos últimos datos se creó el gráfico que mostraba el porcentaje sin fenotipo de activación por TGF- β , el fenotipo activado en muestras control y el fenotipo activado en muestras tumorales.

3.3. Análisis de *scRNAseq* de datos humanos publicados sobre cáncer de próstata

Se hizo una búsqueda bibliográfica de estudios de *scRNAseq* en próstata humana y se encontraron 4 estudios (*datasets*) diferentes. Además, se incluyeron los datos del Tabula Muris de próstata para que los fenotipos tumorales y no tumorales estuvieran igualados. Los cuatro artículos y el Tabula Muris que se seleccionaron se encuentran especificados en la **Tabla M 8**.

Tabla M 8. Artículos seleccionados para el análisis de *scRNAseq* de datos humanos

Título	Revista	Nº muestras	Nº células	Número GEO
Single-cell analysis reveals transcriptomic remodellings in distinct cell types that contribute to human prostate cancer progression	Nature Cell Biology	13	36424	GSE141445
Single-cell analysis of human primary prostate cancer reveals the heterogeneity of tumor-associated epithelial cell states	Nature Communication	6	21743	GSE176031
Identification of a distinct luminal subgroup diagnosing and stratifying early stage prostate cancer by tissue-based single-cell RNA sequencing	Molecular Cancer	2	7904	GSE157703
Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris	Nature	44949	NA	http://tabula-muris.ds.czbiohub.org/
Single-cell analysis of mouse and human prostate reveals novel fibroblasts with specialized distribution and microenvironment interactions	The journal of pathology	20	NA	GSE172357

Los datos brutos o *raw data* se encontraban en diferentes formatos, por lo que se modificaron para ajustarse al *input* de la función *CreateSeuratObject* de la librería de Seurat en el software R version 4.2.2 (2022-10-31). Una vez los *SeuratObjects* fueron creados se analizaron de forma independiente ya que los datos no presentaban una distribución homogénea y cada artículo había procesado los datos de formas diferentes.

En cada *dataset* se realizaron los siguientes pasos: (i) se analizaron parámetros de calidad (número de cuentas, número de genes y porcentaje mitocondrial) para saber si los datos habían sido filtrados o no, (ii) se utilizó una normalización global usando la función *LogNormalized* de la librería Seurat con los parámetros predeterminados, para asegurar que la expresión de los genes en cada célula fuera homogénea, (iii) se identificaron de los *highly variable genes* (*hvg*) utilizando la función *FindVariableFeatures*, (iv) se escalaron los datos y se hizo una reducción de dimensionalidad utilizando el análisis de componentes principales (PCA) en la que solo se utilizaron los *hvg*. Posteriormente, se realizó el análisis de *clustering*, para ello se utilizaron las funciones *FindNeighbors* y *FindClusters* que realizan un *clustering* basado en el algoritmo de *Louvain*. Se probaron diferentes resoluciones para elegir la más óptima que representara los clústeres reales de dicho *dataset*. Una vez se hizo el *clustering*, la visualización de este se hizo con una Aproximación y Proyección de Variedad Uniforme (UMAP). Después de obtener el UMAP, se anotaron las poblaciones de interés utilizando marcadores canónicos: sistema mieloide (*CD33*, *CD68*, *CCL3*, *ITGAM*), sistema linfóide (*CD3E*, *CD3G*, *CD4*, *CD8A*, *CD8B*), células B (*CD79A*, *CD79B*, *MS4A1*), células epiteliales (*EPCAM*, *KRT14*, *KRT17*), fibroblastos (*DCN*, *PDGFRA*, *COL3A1*), células endoteliales (*PECAM1*, *CLDN5*, *FLT1*), células murales (*RGS5*, *CSPG4*, *NOTCH3*, *ACTA2*, *DES*).

Una vez las poblaciones fueron anotadas, se utilizó la función *subset* para extraer las poblaciones estromales no inmunitarias de los *datasets* (células murales, fibroblastos y células endoteliales). Posteriormente, utilizando la función *merge*, los diferentes *datasets* fueron integrados en uno solo, obteniendo un total de 14.629 de células viables. Debido a que se han juntado artículos con diferentes metodologías, se identificó que los diferentes tipos celulares se agrupaban debido al artículo de origen y no debido al tipo celular. Para ello, se utilizaron dos protocolos diferentes para eliminar este *batch effect*: se probó con la integración propuesta por Seurat utilizando las funciones: *SelectIntegrationFeatures*, *FindIntegrationAnchors* y *IntegrateData*; por otro lado, se integró con Harmony (122) siguiendo los pasos de su tutorial. La integración por Seurat no eliminó el *batch effect*. Sin embargo, Harmony obtuvo una distribución homogénea de los *datasets* y agrupó por tipo celular. Tras eliminar el *batch effect*, se volvió a (i) normalizar los datos, (ii) escalarlos, (iii) hacer un análisis de PCA y (iv) volver a hacer el *clustering* a diferentes resoluciones y v) anotar las poblaciones estromales de interés con los marcadores canónicos utilizando anteriormente.

3.4. Análisis transcriptómico

Las muestras de ARN se analizaron con la librería *DeSeq2*. Se generaron y aplicaron diferentes filtros según el *log-foldchange* y el *p-value* con el objetivo de obtener una lista de genes diferencialmente expresados. El análisis de enriquecimiento se hizo con las librerías *org.Mm.eg.db* (123), *AnnotationDbi* (124) y *clusterProfiler* (125,126) (las dos primeras sirven para convertir los nombres de los genes y la última es, específicamente, para hacer en *enrichment*). Después se realizaron los análisis de los genes por separado según si estaban aumentados o disminuidos. Para conseguir las funciones de los genes se usaron las funciones *enrichGO* y *enrichKEGG*. Los resultados de GO y KEGG se obtuvieron usando los genes diferencialmente expresados independientemente de *log-foldchange*. El gráfico se realizó con las funciones significativas (*p-value* < 0,05) más relevantes para el proyecto las cuales se eligieron manualmente.

3.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados con GraphPad Prism software (version 8.4.0(671)). Los datos se representaron con la media $\pm$ S.E.M. (barra de error). Para los análisis con múltiples grupos se realizó Kruskal-Wallis como test estadístico; para analizar dos grupos comparándolos entre ellos, se usó Mann-Whitney test; y, para analizar dos grupos, siendo uno de ellos el control con valor normalizado igual a 1, se usó *One sample t test*.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterización de pericitos en el cáncer de próstata

1.1. La progresión tumoral produce una pérdida de marcadores de pericitos/células murales en muestras humanas analizadas *in silico*

Los pericitos tienen comportamientos aberrantes en diferentes enfermedades incluyendo el cáncer, siendo su papel en el cáncer de próstata totalmente desconocido. La idea central de este proyecto es entender cuál es el papel de los pericitos en el cancer de próstata, así como en su progresión. Para ello, se decidió empezar con un análisis *in silico* usando la plataforma CancerTool que cuenta con 7 bases de datos de PCa, 5 de las cuales contienen tejidos normales, tumor primario y metástasis (Grasso, Lapointe, Taylor, Tomlins, Varambally); y 3 de ellas incluyen el seguimiento clínico y datos de recurrencia (Glinsky, Taylor, TCGA). Para poder estudiar las implicaciones de tipos celulares en concreto en la progresión del cancer es importante tener marcadores fiables de dichas células. Aunque algunos de los marcadores de pericitos son dependientes de tejido, se procedió a usar como marcadores de dichas células marcadores canónicos como *Desmin*, *Anpep*, *Cd248*, *Cspg4*, *Pdgfrb* y *Rgs5*. Cabe destacar, que en el laboratorio se ha demostrado previamente que dichos marcadores se expresan en pericitos de retina durante la angiogénesis del desarrollo (63). Además de los marcadores de pericitos, se introdujo en el análisis *Pecam1*, marcador de células endoteliales como validación de los datos *in silico*. La selección de este marcador endotelial se debe a que el proceso de angiogénesis está muy bien descrito en el contexto tumoral. Se sabe que la presencia de células cancerígenas produce una estimulación de factores angiogénicos, lo que da lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos (9).

Se procedió a comparar la expresión de dichos marcadores en los diferentes grupos que proporciona el CancerTool: tejido normal (N), tumor primario (PT) y metástasis (M). Las diferentes bases de datos mostraron un incremento de la expresión de *Pecam1* cuanto más agresivo era el tumor, mientras que los marcadores de pericitos perdían su expresión con la progresión tumoral (**Figura R 1**).

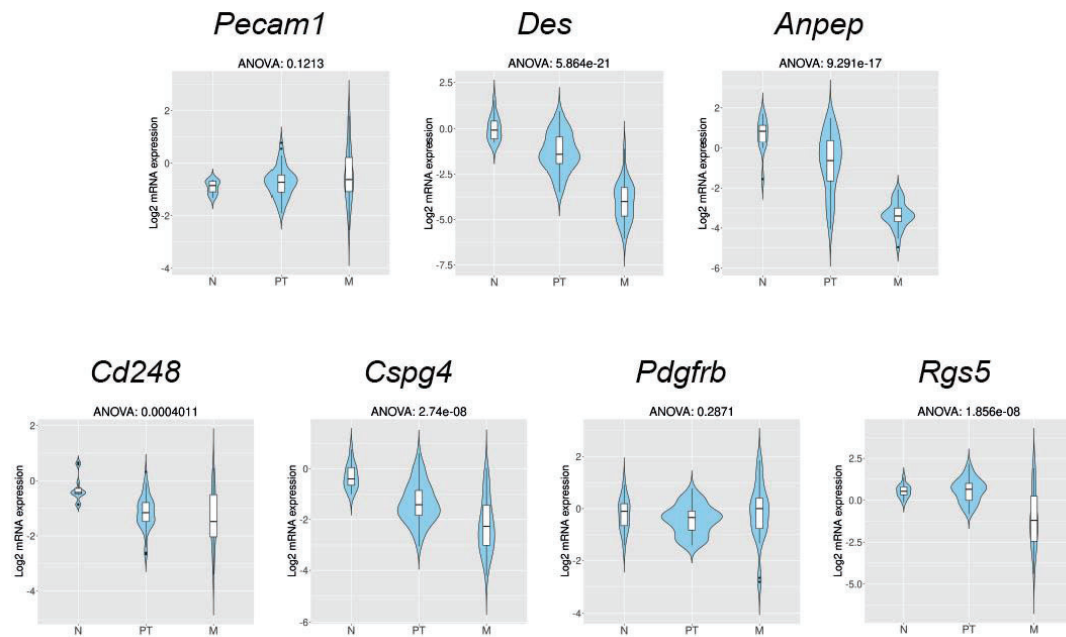


Figura R 1. Los marcadores de pericitos pierden expresión con la progresión de la enfermedad

Representación de la expresión de genes a lo largo del avance tumoral. N = Tejido normal; PT = Tumor primario; M = Metástasis.

La plataforma CancerTool también incluye bases de datos del seguimiento clínico y la recurrencia, permitiendo analizar la supervivencia libre de enfermedad (DFS). El análisis de la DFS aporta información sobre el pronóstico del PCa en relación a la expresión de los marcadores seleccionados previamente. Primero, se observó que el incremento de expresión de *Pecam1* correlacionaba con un peor pronóstico. A continuación, se examinaron los marcadores de pericitos seleccionados y se mostró que la pérdida de *Des*, *Anpep* y *Cd248* se relacionaba con un peor pronóstico (**Figura R 2**). *Des*, *Anpep* y *Cd248* son marcadores de diferenciación de pericitos, siendo su expresión elevada un sinónimo de pericito maduro y funcional. Entre ellos, desmina (*Des*) es el marcador que presenta datos más robustos presentando datos estadísticos de expresión y DFS (p-value = 5,8654e-21 y p-value = 0.0045, respectivamente) entre los tres que comparten fenotipo.

Conjuntamente los datos *in silico* indican que (i) el marcador endotelial (*Pecam1*) indica una relación directa entre incremento de expresión y mal pronóstico como está bien descrito en el proceso de angiogénesis en cáncer (9); (ii) los marcadores de pericitos propuestos tienen comportamientos diferentes durante la progresión tumoral, sobre todo en su correlación con la DFS; y (iii) el fenotipo *in silico* que presenta desmina (*Des*) lo hace un buen candidato para iniciar la caracterización de los pericitos en PCa.

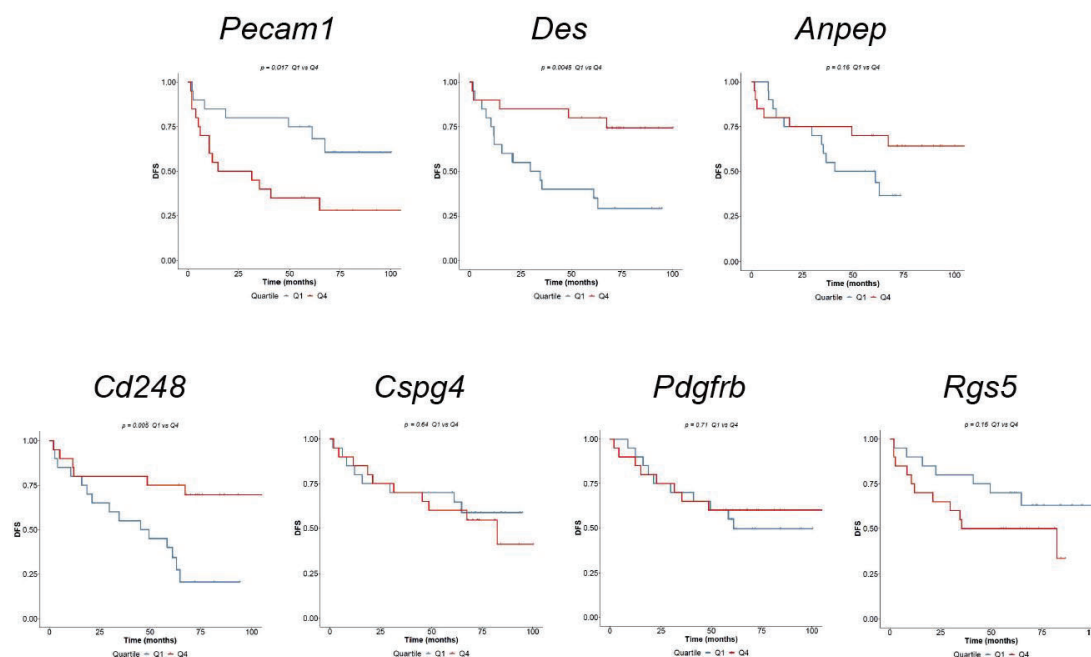


Figura R 2. Desmina es el marcador de pericitos más predictivo en la progresión tumoral

Representación de la supervivencia libre de enfermedad. Q₁ = azul, Q₄ = rojo.

1.2. La presencia tumoral en modelos murinos muestra un incremento en la angiogénesis

A continuación, se procedió a la validación de los datos computacionales obtenidos en el CancerTool en modelos experimentales de cáncer de próstata (**Figuras R 1 y R 2**). Para ello se diseñaron tres modelos murinos que representan diferentes estadios del cáncer de próstata: Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}) y Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox}). Con la finalidad de desarrollar dichos modelos, se introdujeron modificaciones genéticas de los genes *Pten* y *Lkb1* bajo el control de la *Probasin-Cre*. El constructor *Probasin-Cre* consta del promotor *Probasin*, el cual se activa durante la pubertad en el epitelio glandular de la próstata, y la proteína recombinasa *Cre*, la cual lleva a cabo las recombinaciones genéticas de *Pten* y *Lkb1*.

Primero se validaron los resultados con *Pecam1* haciendo un estudio de la angiogénesis tumoral en la próstata. Para ello, se hicieron tinciones de inmunofluorescencia de CD31 (proteína de *Pecam1*) en los tres modelos murinos (**Figura R 3A**). Con la finalidad de estudiar la angiogénesis, se realizaron dos análisis diferentes: expresión de CD31 en el tejido y número de vasos sanguíneos. Se vio un leve incremento de la expresión de CD31 con la progresión tumoral (**Figura R 3B**) y un mayor número de vasos relacionado con la presencia tumoral (**Figura R 3C**).

Estos datos son consistentes con la noción que la progresión tumoral se asocia a un incremento de angiogénesis. Además, son coherente con la información obtenida mediante el análisis computación del CancerTool, validando así el uso de la herramienta para el estudio de las células murales, las otras células que forman los vasos sanguíneos.

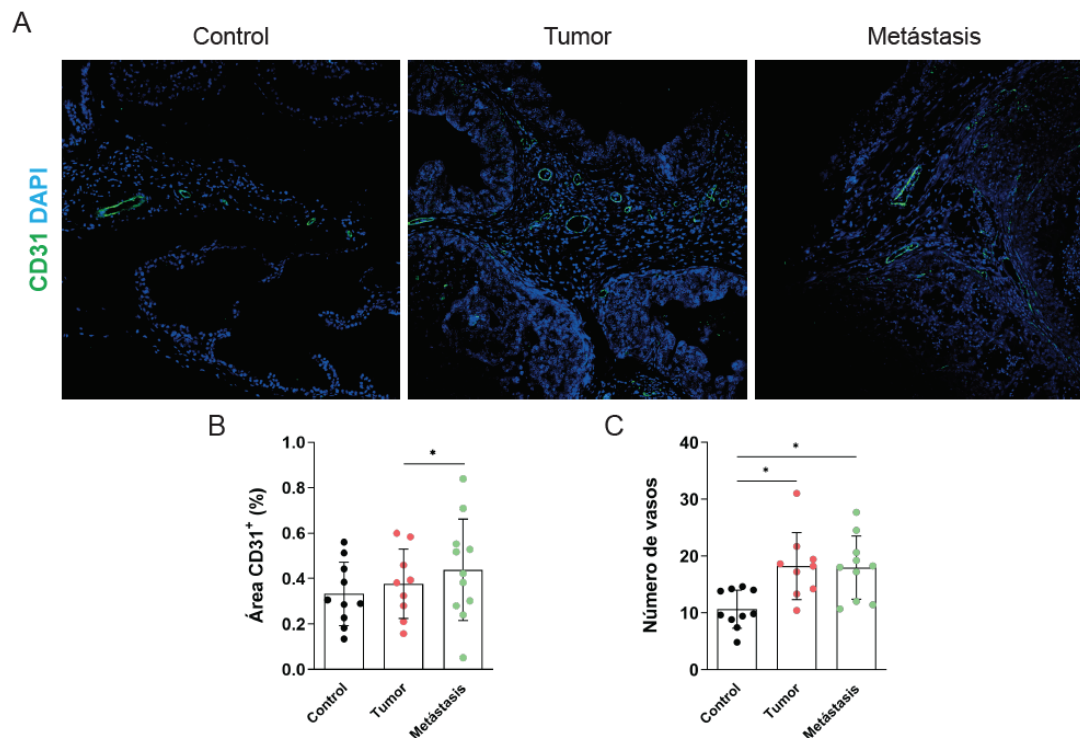


Figura R 3. La angiogénesis se ve incrementada con la aparición del cáncer

(A) Imágenes representativas de próstatas Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}) y Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox}) teñidas para CD31 (verde). (B) Cuantificación del área positiva de CD31. (C) Cuantificación del número de vasos sanguíneos. n = 9-10. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Kruskal-Wallis. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.0001 se consideraron estadísticamente significativos.

1.3. La expresión de desmina en áreas perivasculares disminuye con la agresividad tumoral

A continuación, se inició el estudio de desmina en pericitos mediante tinciones de inmunofluorescencia. Inesperadamente, desmina mostró un patrón inespecífico para pericitos (**Figura R 4**). Fueron identificadas dos áreas de expresión distintas: zona perivascular (**Figura R 4a**) y zona glandular (**Figura R 4b**). Se sabe que los pericitos se localizan entorno a los vasos. Por ello se consideró que las células con expresión de desmina ubicadas rodeando las glándulas debían corresponder a la capa fibromuscular descrita en la bibliografía (15,127).

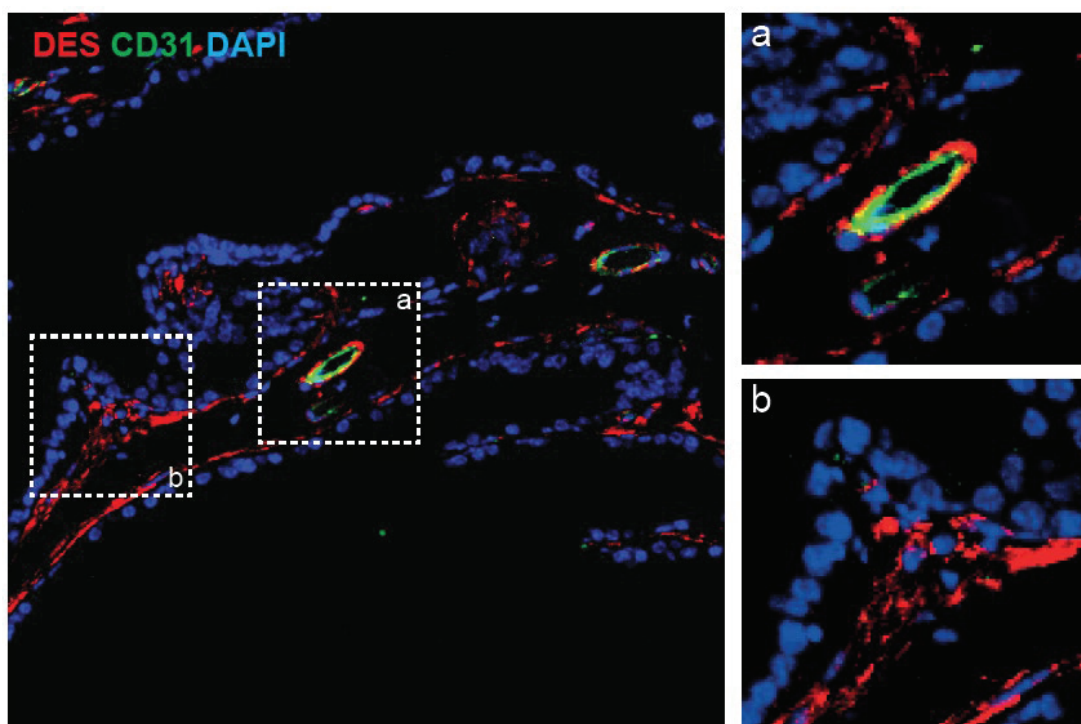


Figura R 4. La expresión de desmina se encuentra en áreas perivasculares y glandulares

Inmunodetección por fluorescencia de las proteínas desmina (rojo) y CD31 (verde) en tejido estromal de próstata murina. Las regiones marcadas se amplían a la derecha indicando (a) un vaso sanguíneo y (b) una zona de capa fibromuscular entorno a la glándula.

A pesar de la inespecificidad del marcador, la posibilidad de identificar y diferenciar ambas áreas permitía continuar con la caracterización de desmina (**Figura R 5A**). Teniendo en cuenta que los datos obtenidos del CancerTool incluyen todo el tejido prostático, se decidió analizar la expresión total (área glandular y perivascular) de desmina la cual se vio reducida de igual manera en el modelo tumoral y en el metastático (**Figura R 5B**). Este resultado determina que la aparición del tumor es suficiente para afectar a la totalidad de células positivas para desmina.

Como el objetivo del proyecto es conocer el papel de los pericitos en el PCa, nos centramos en las células que recubren el área perivascular. Dicho análisis mostró una pérdida de expresión de desmina con el inicio de la carcinogénesis que se hacía más pronunciada con la agresividad tumoral (**Figura R 5C**). Este resultado muestra una relación directa entre progresión tumoral y disminución de desmina en la zona perivascular. El estudio de los pericitos en próstata es escaso y controvertido en cuanto a la caracterización celular, pero existen resultados que relacionan la pérdida de desmina en los vasos con la presencia tumoral (128).

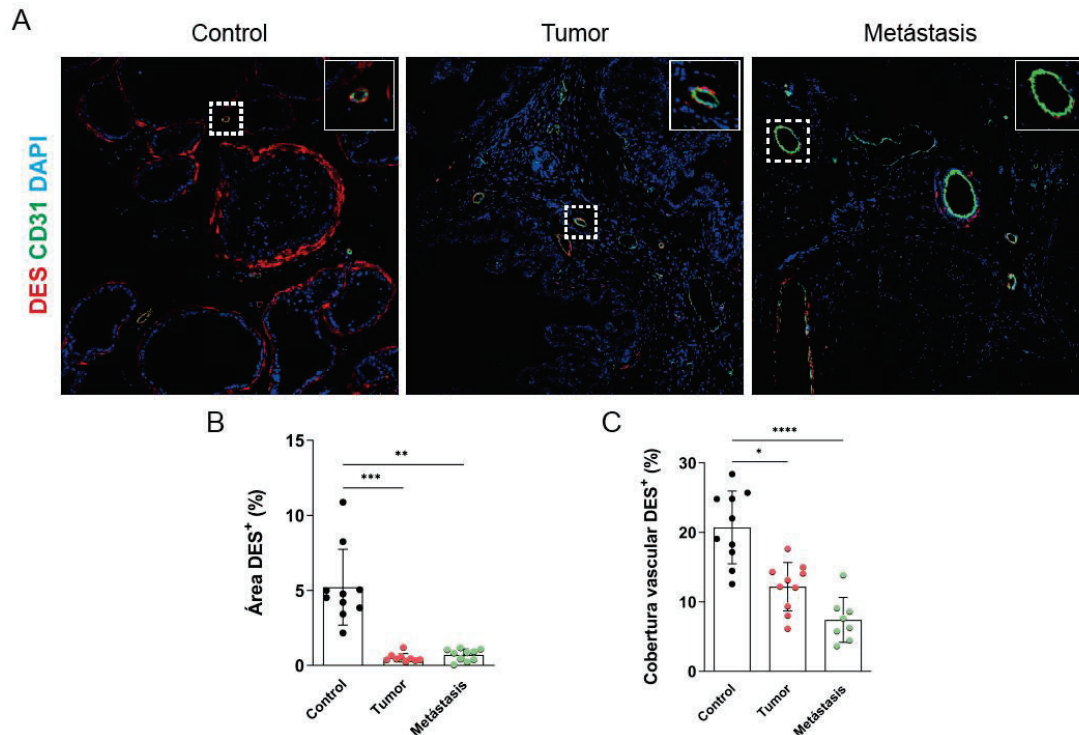


Figura R 5. La expresión de desmina en la cobertura vascular disminuye progresivamente con la agresividad tumoral

(A) Imágenes representativas de próstatas Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}) y Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox}) teñidas para desmina (rojo) y CD31 (verde). (B) Cuantificación del área positiva de DES en todo el tejido prostático. (C) Cuantificación del área positiva de DES en la cobertura del vaso sanguíneo. n = 8-10. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Kruskal-Wallis. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.0001 se consideraron estadísticamente significativos.

1.4. La cobertura del vaso se mantiene aún con el avance de la enfermedad

Los marcadores de pericitos son dependientes de tejido y el poco estudio en próstata abre un panorama desconocido e interesante. Es por ello que se decidió analizar la expresión de los otros marcadores seleccionados inicialmente (*Anpep*, *Cd248*, *Cspg4*, *Pdgfrb* y *Rgs5*). Hubo limitaciones en la puesta a punto de las IF de los marcadores en las muestras de PCa incluidas en parafina, dichas complicaciones obligaron a la selección de un nuevo marcador de estudio. La elección fue *Acta2* ya que se considera un marcador de células murales y, en algunos casos, también marcador de pericitos (57,128). Tras seleccionar *Acta2* como candidato, lo primero que se hizo fue estudiar su comportamiento en el CancerTool como se había realizado anteriormente con los demás marcadores. Como se puede observar en la **Figura R 6**, la expresión de *Acta2* disminuye con la progresión tumoral (**Figura R 6A**) y esta pérdida de marcador va relacionada con una menor DFS (**Figura R 6B**). Estos resultados concuerdan con los

obtenidos con *Des* y proporcionan un marcador alternativo para completar la caracterización.

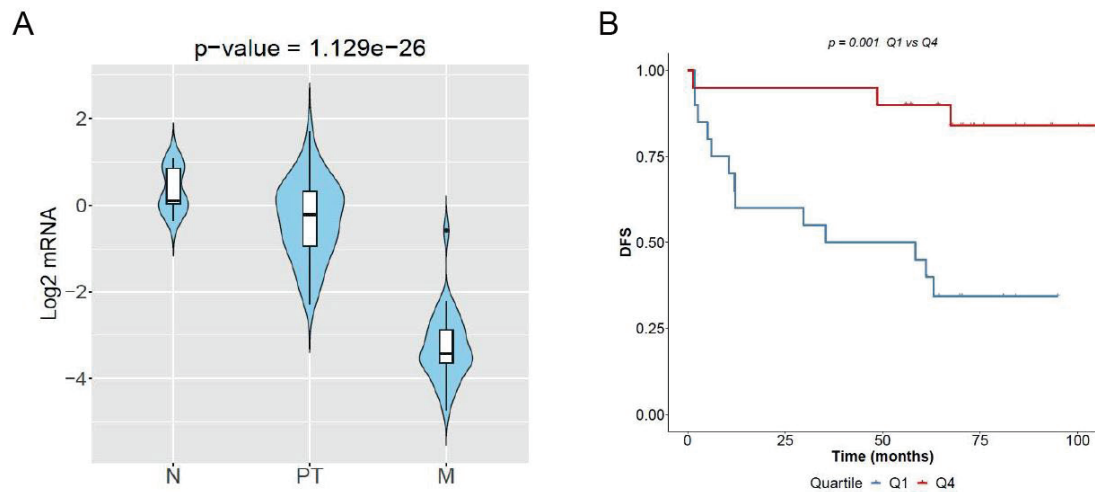


Figura R 6. *Acta2* tiene el mismo comportamiento que *Des* en cuanto a expresión y DFS

El siguiente paso consistió en validar α SMA (proteína de *Acta2*) mediante inmunofluorescencia. Lo primero que se observó fue que α SMA seguía el mismo patrón de expresión que desmina, una doble señalización en áreas perivasculares y glandulares (**Figura R 7A**). Al igual que con desmina, debido a que el CancerTool incluye datos de todo el tejido prostático, se analizó la expresión total del marcador y se vio una pérdida con el inicio de la carcinogénesis (**Figura R 7B**). Estos resultados serían coherentes con los obtenidos en el CancerTool.

Al centrar el análisis en la zona perivascular, donde se encuentran los pericitos, no se observaron cambios en la expresión con la progresión tumoral (**Figura R 7C**). Esta diferencia de patrón entre α SMA y *Des* sugiere que (i) la cobertura vascular se mantiene aún con el avance de la enfermedad; y (ii) el marcador de desmina en los vasos podría estar más relacionado con los pericitos mientras que α SMA podría expresarse en ambos, pericitos y vSMC.

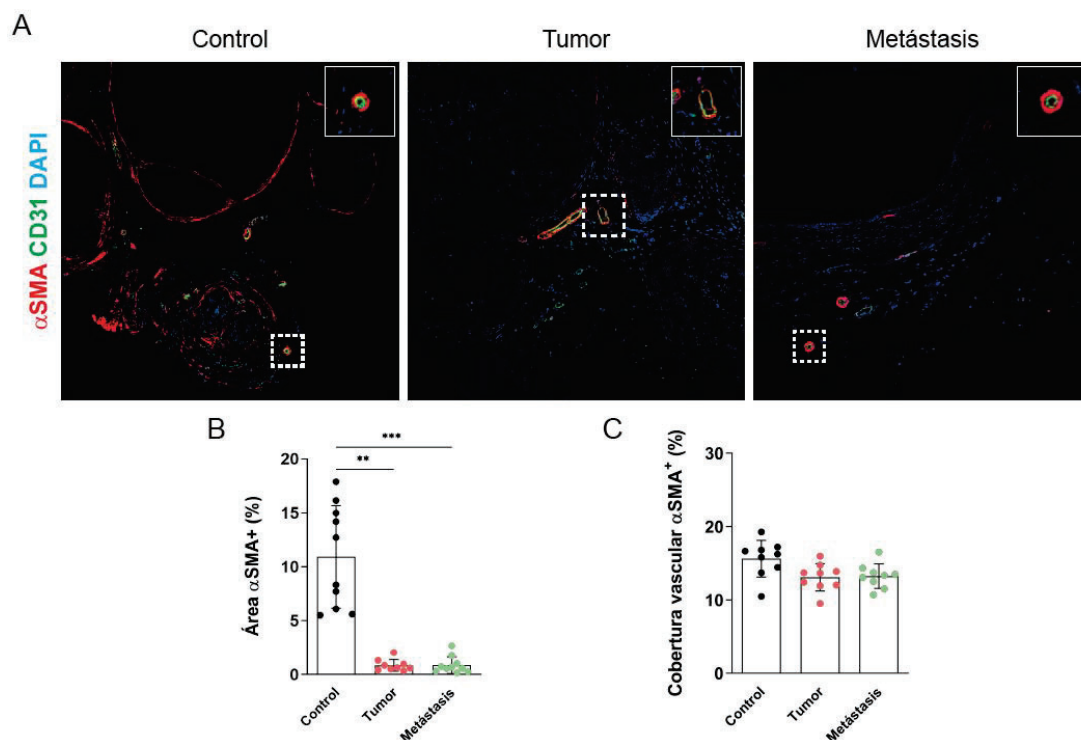


Figura R 7. La expresión de α SMA en la cobertura vascular no se ve modificada con la agresividad

(A) Imágenes representativas de próstatas Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}) y Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox}) teñidas para α SMA (rojo) y CD31 (verde). (B) Cuantificación del área positiva de DES en todo el tejido prostático. (C) Cuantificación del área positiva de DES en la cobertura del vaso sanguíneo. n = 9-10. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Kruskal-Wallis. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.0001 se consideraron estadísticamente significativos.

1.5. La pérdida de desmina en la cobertura vascular depende de la agresividad tumoral

El objetivo final de este proyecto es testear y encontrar tratamientos que puedan recuperar las características basales de los vasos sanguíneos y los pericitos en la cobertura basal, esperando recuperar o incrementar la expresión de desmina en estos últimos. Los modelos murinos de PCa bajo el control de la *Probasin-Cre* caracterizados hasta el momento se procesaron a los 6 meses de crecimiento tumoral. Este proceso es demasiado prolongado para ensayos *in vivo* con tratamientos o inhibidores, por este motivo se diseñaron dos modelos murinos ortotópicos. Uno de ellos se realizó con células murinas Pb-Cre-PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox} procedentes de ratones con un genotipo más agresivo que los caracterizados anteriormente, el segundo con células DU145 pertenecientes a una línea celular humana de PCa. En ambos casos se cultivaron las células *in vitro* para, posteriormente, inyectarlas en la próstata de ratones *wildtype*. Tras procesar los tumores obtenidos, se analizaron desmina y α SMA con el objetivo de

estudiar el comportamiento de los marcadores y, por ende, decidir si eran adecuados como modelos alternativos.

En los tumores ortotópicos $PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox}$ se estudiaron tres estadios diferentes: 3, 6 y punto final (8-15) semanas de crecimiento tumoral. Como el objetivo es valorar la afectación de la cobertura vascular, se analizó la expresión de los marcadores en dicha área. Al comparar con los modelos analizados previamente, se observó una pérdida mayor de desmina en la cobertura vascular, la cual fue evidente desde el tiempo más corto de 3 semanas (**Figura R 8A**). Estos datos sugieren que este es un buen modelo de cáncer de próstata con baja expresión de desmina en los pericitos.

En el caso de α SMA, se vio una reducción en la expresión comparando con los modelos anteriores, pero se mantenían estables entre los 3 tiempos estudiados del modelo ortotópico (**Figura R 8B**). Teniendo en cuenta el genotipo más agresivo de estas células tumorales, la pérdida de α SMA puede ser debida al incremento en agresividad del modelo. Aun así, obtener niveles de expresión iguales en los 3 tiempos analizados permite seguir considerando α SMA como un marcador informativo sobre la cobertura vascular.

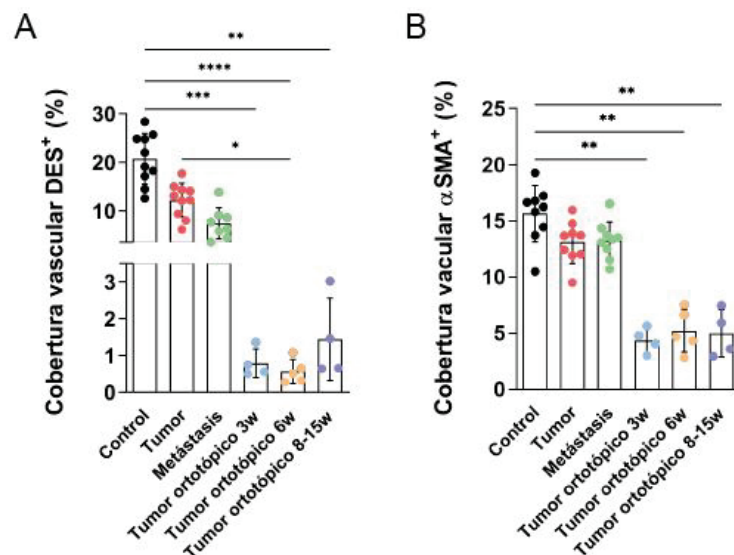


Figura R 8. En los tumores ortotópicos $PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox}$ hay una pérdida mucho más acusada de la expresión de desmina

Análisis de la cobertura vascular en los modelos Control (Pb-Cre- $PTEN^{WT/WT}$), Tumor (Pb-Cre- $PTEN^{flox/flox}$), Metástasis (Pb-Cre- $PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox}$) y Tumores ortotópicos (Pb-Cre- $PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox}$) (A) Cuantificación del área positiva de DES en la cobertura del vaso sanguíneo. (B) Cuantificación del área positiva de α SMA en la cobertura del vaso sanguíneo. $n \geq 4$. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

Por otro lado, se estudiaron los tumores procedentes de las células humanas DU145. El modelo mostró una pérdida mayor de desmina en la cobertura vascular comparado con los modelos iniciales (**Figura R 9A**). Además, si se observan los valores detenidamente, el porcentaje de cobertura vascular de este modelo DU145 también tiene menor expresión de desmina que los modelos ortotópicos caracterizados en el apartado anterior (**Figura R 8A**). Esto sugiere que el modelo DU145 podría ser el más agresivo de todos, yendo la pérdida de expresión de desmina acorde con este comportamiento tumoral. También es posible que la pérdida de expresión en desmina sea simplemente un reflejo de rápido crecimiento tumoral de este modelo. Esto sugeriría que el modelo DU145 no es un modelo ideal para estudiar la biología que esconde la pérdida de desmina, pero si podría ser un buen modelo preclínico para estudiar posibles tratamientos que restablezcan la función y expresión de marcadores canónicos de los pericitos.

Tal y como se muestra en la **Figura R 9B**, la expresión de α SMA también disminuye en este modelo ortotópico. Si los resultados se comparan con los tumores PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox}, se puede apreciar que la expresión del marcador en los 4 modelos se encuentra entorno al 5% (**Figura R 8B**). Este resultado nos reafirma que α SMA puede ser un buen marcador de cobertura vascular con menor dependencia que desmina a la agresividad tumoral.

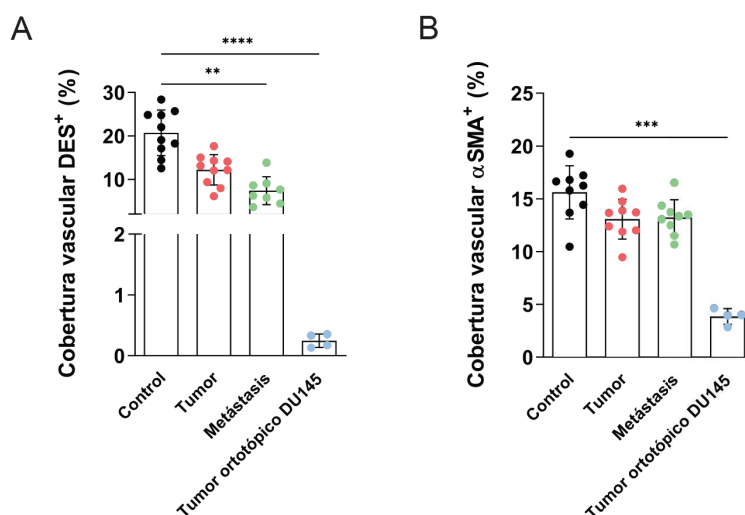


Figura R 9. La expresión de desmina en la cobertura vascular disminuye en los modelos ortotópicos DU145

Análisis de la cobertura vascular en los modelos Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}), Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox}) y Tumor ortotópicos de células humanas (DU145) (A) Cuantificación del área positiva de DES en la cobertura del vaso sanguíneo. (B) Cuantificación del área positiva de α SMA en la cobertura del vaso sanguíneo. $n \geq 4$. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

Teniendo en cuenta los análisis realizados, ambos modelos ortotópicos tienen características adecuadas para ser usado como modelos murinos de PCa en ensayos *in vivo* con tratamientos. En el caso de los modelos ortotópicos PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox}, el crecimiento tumoral de 3 semanas permitiría realizar los experimentos en el menor tiempo posible. Por otro lado, el modelo tumoral DU145 ofrece un fenotipo más agresivo.

1.6. Las muestras humanas muestran un comportamiento similar en la expresión de desmina en los vasos sanguíneos ante la agresividad del tumor

Una vez caracterizados los modelos murinos, se decidió comprobar si los resultados obtenidos eran replicables en muestras humanas. Para ello se recogió una cohorte de tumores primarios de PCa a los cuales se les realiza un seguimiento postquirúrgico de unos 8 años. Estas biopsias se agruparon según las características del tumor primario y de la recurrencia metastática posterior a la operación (**Tabla R 1**). Teniendo en cuenta este método de clasificación, se seleccionaron 11 pacientes con 2 fenotipos tumorales diferentes: (i) Tumores sin recurrencia: Incluye 6 pacientes con tumores primarios de Gleason 7 y sin recurrencia metastática tras la cirugía. Este grupo se nombró como grupo "Tumor" en los análisis realizados; (ii) Tumores con recurrencia metastática: Incluye 5 pacientes con tumores primarios agresivos de Gleason 7 y/o con recurrencia metastática ósea, en ganglios o en múltiples zonas. Este grupo se nombró como grupo "Metástasis" en los análisis realizados.

Se optó por estos fenotipos por ser los más similares a los obtenidos en los modelos murinos. Los tumores de ratón Pb-Cre-PTEN^{flox/flox} (Tumor) tienen un fenotipo homólogo a los tumores humanos sin recurrencia ya que la modificación genética de *Pten* no crea metástasis a largo plazo. A su vez, los tumores Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox} (Metástasis) imitarían a los tumores humanos con recurrencia metastática debido a que la combinación genética de *Pten/Lkb1* provoca el desarrollo de metástasis. Aun así, en este último caso, hay que tener en consideración que la metástasis en el modelo murino aparece con el tumor primario a diferencia de las biopsias humanas.

Tabla R 1. Estadios de las biopsias humanas

Paciente	Tipo de muestra	Características del tumor primario	Gleason	Estadio	Metástasis
Paciente 1	PCa no recurrente	Adenocarcinoma de próstata de tipo convencional, moderadamente diferenciado	7	3a	NO
Paciente 2	PCa no recurrente	Adenocarcinoma de próstata de tipo convencional, moderadamente diferenciado	7	2c	NO
Paciente 3	PCa no recurrente	Adenocarcinoma de próstata de tipo convencional, moderadamente diferenciado	7	3a	NO
Paciente 4	PCa no recurrente	Adenocarcinoma de próstata de tipo convencional, moderadamente diferenciado	7	2c	NO
Paciente 5	PCa no recurrente	Adenocarcinoma de próstata de tipo convencional, moderadamente diferenciado	7	2c	NO
Paciente 6	PCa no recurrente	Adenocarcinoma de próstata de tipo convencional, moderadamente diferenciado	7	2c	NO
Paciente 7	PCa recurrente metastático	Adenocarcinoma de próstata moderada-escasamente diferenciado	9	3a	Ósea
Paciente 8	PCa recurrente metastático	Adenocarcinoma de próstata de tipo convencional	7	2c	Ganglios no regionales
Paciente 9	PCa recurrente metastático	Adenocarcinoma de próstata bilateral, de tipo convencional, moderada-pobremente diferenciado	9	3a	Múltiples
Paciente 10	PCa recurrente metastático	Adenocarcinoma de próstata pobremente diferenciado	9	3b	Ganglios no regionales
Paciente 11	PCa recurrente metastático	Adenocarcinoma de próstata de tipo convencional, moderada-pobremente diferenciado	9	3b	Múltiples

Una vez decididos los fenotipos tumorales humanos más adecuados, se inició la caracterización por el estudio de la angiogénesis tumoral (**Figura R 10A**). Se realizaron los mismos análisis que en las muestras murinas: expresión total de CD31 en el tejido prostático y número de vasos. Los datos obtenidos mostraron una tendencia a perder expresión de CD31 en las biopsias recurrentes (**Figura R 10B**), pero manteniendo el mismo número de vasos (**Figura R 10C**). Estos resultados sugieren una reducción de tamaño en los vasos sanguíneos.

Para validar el tamaño vascular, se examinó el lumen de los vasos sanguíneos y los resultados indicaron una tendencia a la disminución del tamaño de estos (**Figura R 10D**). Se sabe que la alta densidad microvascular es un marcador de mal pronóstico descrito en diversos tipos de cáncer, incluido el PCa (60,64). Considerando esta información, los resultados sugieren que las biopsias humanas con recurrencia metastática postquirúrgica podrían tener una predisposición a la formación o mantenimiento de vasos de menor tamaño los cuales potenciarían el proceso de colonización e invasión.

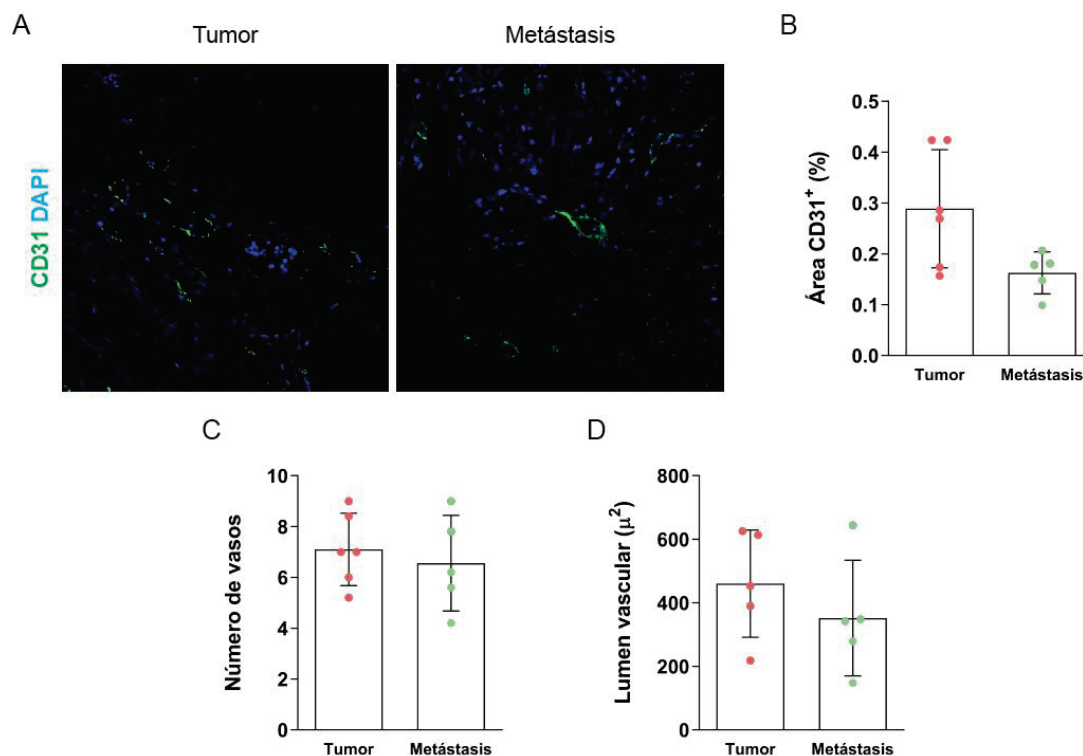


Figura R 10. El tamaño de los vasos sanguíneos se reduce con la recurrencia de la enfermedad

(A) Imágenes representativas de próstatas Tumor (tumores sin recurrencia) y Metástasis (tumores con recurrencia metastásica) teñidas para CD31 (verde). (B) Cuantificación del área positiva de CD31. (C) Cuantificación del número de vasos sanguíneos. (D) Cuantificación del lumen vascular. $n = 5-6$. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Mann-Whitney. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

A continuación, se prosiguió con la caracterización de desmina y α SMA en las zonas perivasculares. El estudio de desmina (**Figura R 11A**) mostró una tendencia en la pérdida de expresión en los pacientes con recurrencia metastásica (**Figura R 11B**). Estos resultados son coherentes con los obtenidos previamente en los modelos murinos, tanto los genéticamente modificados como los ortotópicos.

En el caso de la expresión de α SMA se observó también una disminución del marcador (**Figura R 11C**). Analizando y comparando detalladamente los porcentajes de expresión, se comprobó que el fenotipo humano no recurrente tiene un porcentaje de cobertura del 5% al igual que los modelos murinos más agresivos de la **Sección 1.5**. Esto confirmaría la agresividad del tumor recurrente metastático. Además, estos datos reforzarían la idea descrita sobre que el incremento de la agresividad puede reducir la expresión de α SMA en la cobertura vascular, pero manteniendo niveles más elevados que desmina.

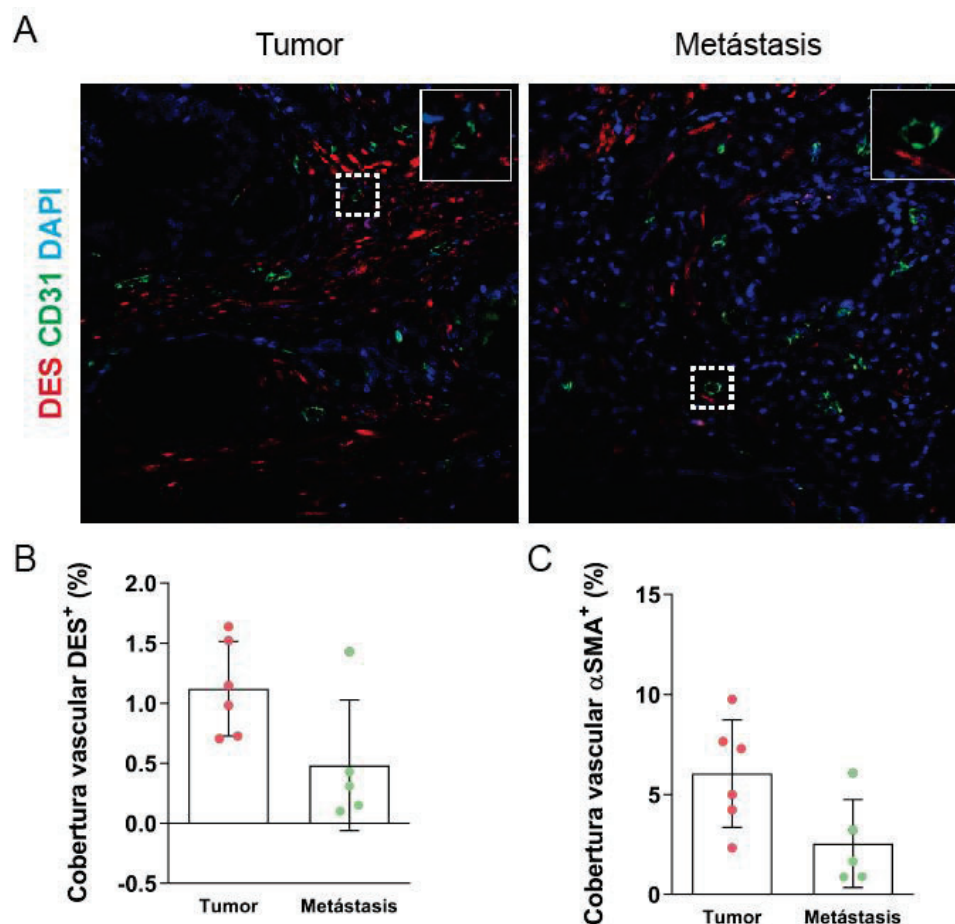


Figura R 11. La expresión de desmina en la cobertura vascular disminuye en condiciones metastáticas, al igual que en las muestras de ratón

(A) Imágenes representativas de próstatas Tumor (tumores sin recurrencia) y Metástasis (tumores con recurrencia metastásica) teñidas para desmina (rojo) y CD31 (verde). (B) Cuantificación del área positiva de DES en la cobertura del vaso sanguíneo. (C) Cuantificación del área positiva de α SMA en la cobertura del vaso sanguíneo. $n = 5-6$. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Mann-Whitney. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados de las muestras humanas sugieren comportamientos similares a los obtenidos en los modelos murinos, tanto en la pérdida de desmina perivascular como la reducción de α SMA según la agresividad del tumor. Estos análisis se complementarán y ampliarán con mayor número de muestras a medida que la cohorte de biopsias se incremente.

1.7. La cobertura del vaso no se ve modificada por la agresividad tumoral

A lo largo de la caracterización, se ha valorado el mantenimiento de la cobertura por la presencia de α SMA. A su vez, se ha descrito la pérdida de desmina en el área perivascular sin determinar si dicha reducción es debida cambio en la entidad del pericito

o a una desaparición de los pericitos en la cobertura vascular. Con el objetivo de dar respuesta a esta incógnita, se decidió usar la microscopía electrónica como técnica para detectar la presencia o no de pericitos entorno a los vasos sanguíneos. Para este análisis se utilizaron dos muestras de próstatas control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}) y dos metastásicas (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};Lkb1^{flox/flox}), genotipos que fueron escogidos para comparar las condiciones tumorales más extremas.

La microscopía electrónica ha permitido caracterizar y detallar una gran cantidad de células y sus componentes en diferentes tejidos. Existen artículos sobre próstata y PCa que contienen análisis realizados con microscopía electrónica, aunque son escasos los que muestren estudios centrados en pericitos en dicho tejido (129,130). Usando la limitada información publicada y la descripción de las células estromales en otros órganos, se iniciaron las observaciones para caracterizar y diferenciar las diferentes células localizadas cerca de los vasos sanguíneos. Se consiguieron identificar células endoteliales (EC), pericitos (PC), células vasculares de músculo liso (SMC) y fibroblastos (FB) (**Figura R 12**).

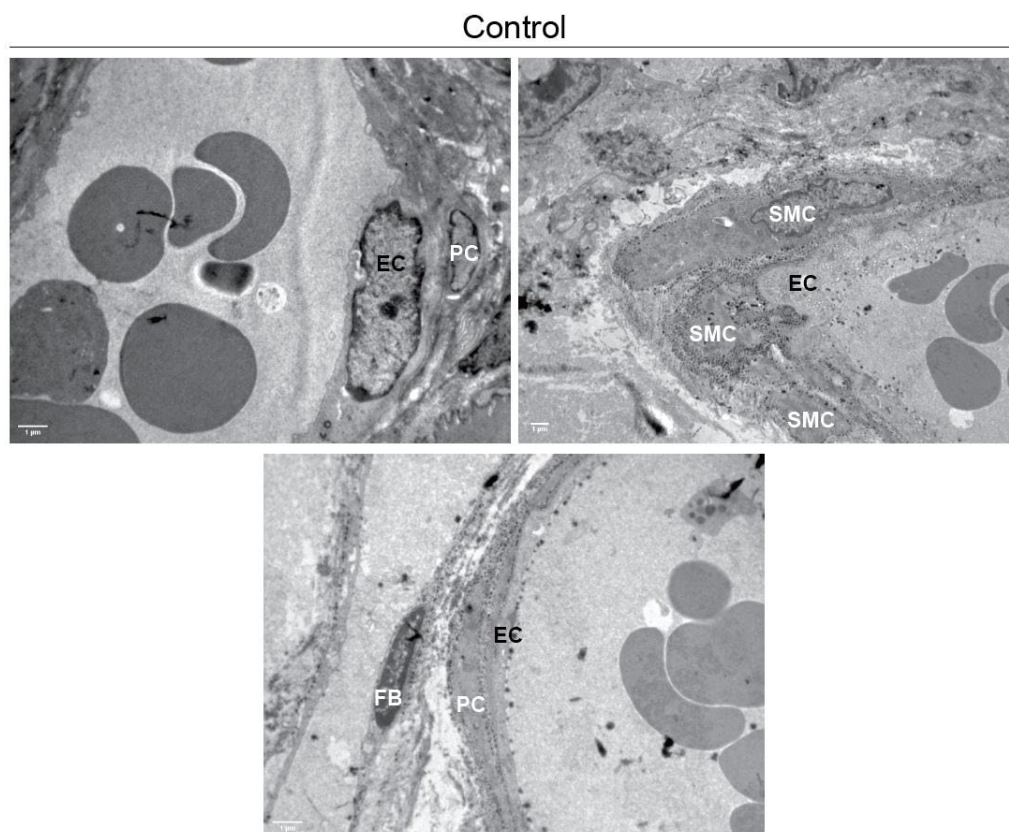


Figura R 12. La microscopía electrónica permite caracterizar e identificar las células vasculares

Imágenes representativas de microscopía electrónica de las células estromales relacionadas con los vasos sanguíneos en próstatas Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}). EC = célula endotelial; PC = pericito; SMC = célula vascular de músculo liso; FB = fibroblasto.

Las células endoteliales se identificaron por su localización formando el vaso sanguíneo, dejando el espacio luminal en su interior muchas veces con presencia de eritrocitos o glóbulos blancos. Los pericitos y las SMC se diferenciaron por su morfología y proximidad a las EC. Los pericitos se localizaban en contacto directo con las EC; mientras que las SMC se encontraban más alejadas. Además, la morfología de los pericitos se caracterizó por un cuerpo redondeado con finas prolongaciones entorno a las EC; en cambio las SMC mostraban un cuerpo romboide de mayor tamaño, más alargado y, normalmente, en agrupación celular ya sea en monocapa o superpuestas. Finalmente, los fibroblastos se identificaron por estar separados del vaso sanguíneo y tener una morfología muy elongada.

Una vez diferenciadas correctamente las células de interés, se seleccionaron entre 30 y 45 vasos sanguíneos por fenotipo y se consideró si dichos vasos tenían o no pericitos en su cobertura vascular. Tras una minuciosa observación, se observó que no había diferencias entre la cobertura vascular control y metastática ya que, en ambos casos, había pericitos en la mayoría de vasos (**Figura R 13**). Estos datos indican que no hay una pérdida de pericitos en la zona perivascular y sugieren que dichos pericitos están sufriendo cambios en su perfil molecular.

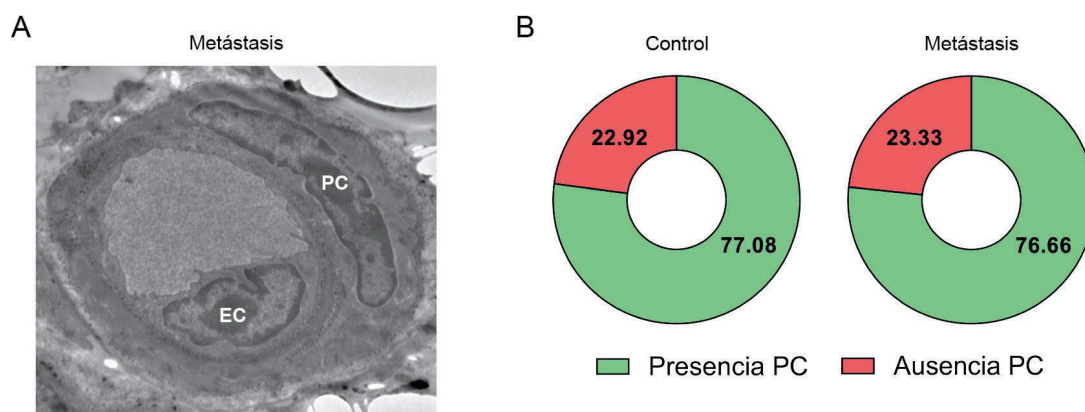


Figura R 13. La microscopia electrónica demuestra que la cobertura vascular se mantiene con la agresividad

(A) Imagen representativas de TEM de vaso sanguíneo con cobertura de pericitos (PC) en próstata Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox}). EC = célula endotelial; PC = pericito. (B) Cuantificación de presencia o ausencia de pericitos en la cobertura vascular. $n \geq 30$. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Mann-Whitney. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

2. La señalización de TGF- β produce la pérdida de expresión de desmina y un cambio de identidad en los pericitos/células murales

2.1. Las células murales procedentes de muestras tumorales tienen un mayor fenotipo de respuesta a TGF- β

A continuación, se precedió a identificar el mecanismo que produce el cambio de identidad en los pericitos aplicando la tecnología de *ARNseq* de célula única (*single cell* en inglés) de PCa. Para ellos se utilizaron muestras procesadas previamente en el laboratorio (datos no publicados) por el doctorando Hielke van Splunder. Los análisis bioinformáticos posteriores realizados específicamente para este proyecto fueron ejecutados por la doctoranda Ane M. Larrinaga.

La elección de grupos murinos a analizar se basó en los datos de caracterización mostrados en la **Figura R 5C** donde se observó que la pérdida de desmina en la cobertura vascular se producía con el inicio de la carcinogénesis. Es por ello que se procesaron tres próstatas murinas control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}) y tres tumores (Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}). Una vez secuenciadas se hizo un control de calidad de las células, se realizó una corrección de *batch effect* para eliminar las diferencias técnicas a nivel de fenotipo y se identificaron los diferentes grupos celulares mediante marcadores canónicos. Se obtuvieron 6 grandes grupos: células epiteliales, células mieloides, células linfoides, células endoteliales, fibroblastos y células murales. La limitación en el número de células murales secuenciadas impide la diferenciación entre pericitos y vSMC. Es por ello que los análisis bioinformáticos fueron realizados sobre el grupo general de células murales y, después, se validaron con bases de datos humanas y técnicas *in vitro* en pericitos primarios de ratón.

Los datos biológicos mostraban una expresión de desmina en zonas glandulares y perivasculares (**Figura R 3**), por ello, la primera comprobación que se realizó con los datos de *scRNAseq* fue determinar qué grupos celulares expresaban desmina. Se observó que los grupos con mayor expresión corresponden a los definidos como células murales y fibroblastos (**Figura R 14**). Estos datos sugieren que la zona perivascular podría asociarse a las células murales y, por consiguiente, la zona glandular podría a los fibroblastos.

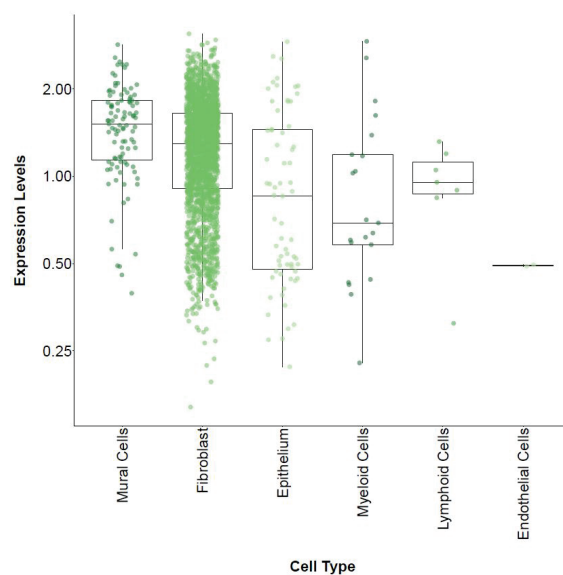


Figura R 14. La expresión de desmina se localiza en las poblaciones de células murales y fibroblastos

Expresión de desmina por tipo celular ordenados de mayor a menor expresión y representada con *box plots*.

En la caracterización *in vivo* se compararon los patrones de desmina en los modelos tumorales (**Figura R 5**). Por este motivo, se decidió comprobar en los datos de *scRNAseq* la expresión de desmina por fenotipo y no se observaron cambios en la expresión de células murales entre control y tumor (**Figura R 15**). Posiblemente, la diferencia de resultados entre *in vivo* e *in silico* se debe al bajo número de células analizadas. Por otro lado, la pérdida de expresión en el grupo de fibroblastos es coherente con las observaciones de las zonas glandulares.

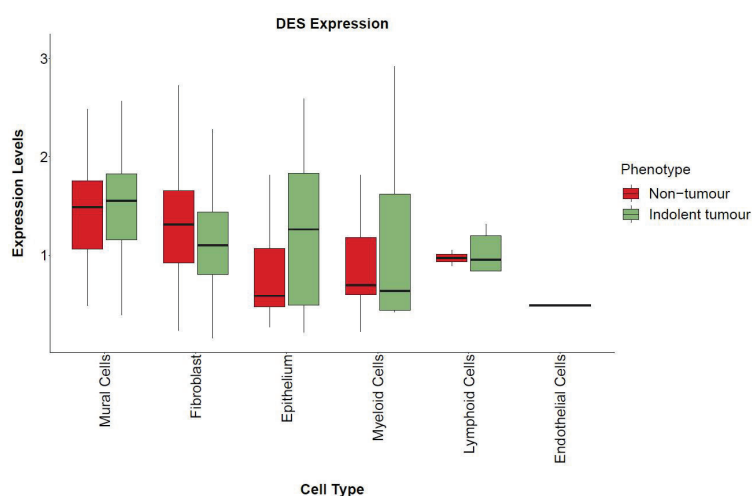


Figura R 15. La expresión de desmina no varía entre células murales control y tumorales

Expresión de desmina por tipo celular y fenotipo ordenados de mayor a menor expresión y representada con *box plots*.

Con el objetivo de encontrar el mecanismo que produce el cambio molecular de los pericitos, se decidió llevar a cabo un análisis de interactome del cual que presenta la probabilidad de interacción de las vías de señalización entre el grupo receptor y diana, en este caso se utilizó como célula diana el grupo de células murales. Para detectar vías de señalización diferenciales entre muestras control y tumorales, los análisis se realizaron por separado. El primer dato relevante que se obtuvo fue que, en tanto en control como en tumor, las vías con más interacciones fueron Colágeno y Laminina (**Figura R 16**). Se sabe que ambas vías se encuentran relacionadas con las células mesenquimales, dentro de las cuales se incluyen las células murales, debido a su implicación en la matriz extracelular y la membrana basal. Por tanto, como las vías de Colágeno y Laminina tienen una funcionalidad muy general, se decidió no tenerlas en cuenta como posibles mecanismos que interviniesen en los cambios de los pericitos. Al analizar las demás vías de señalización, se detectó que en tumores la vía de TGF- β era la que tenía más probabilidades de interacción con las células murales (**Figura R 16A**). Además, esta no se encontraba entre las vías de señalización de las muestras control (**Figura R 16B**), de manera que era exclusiva de la condición tumoral.

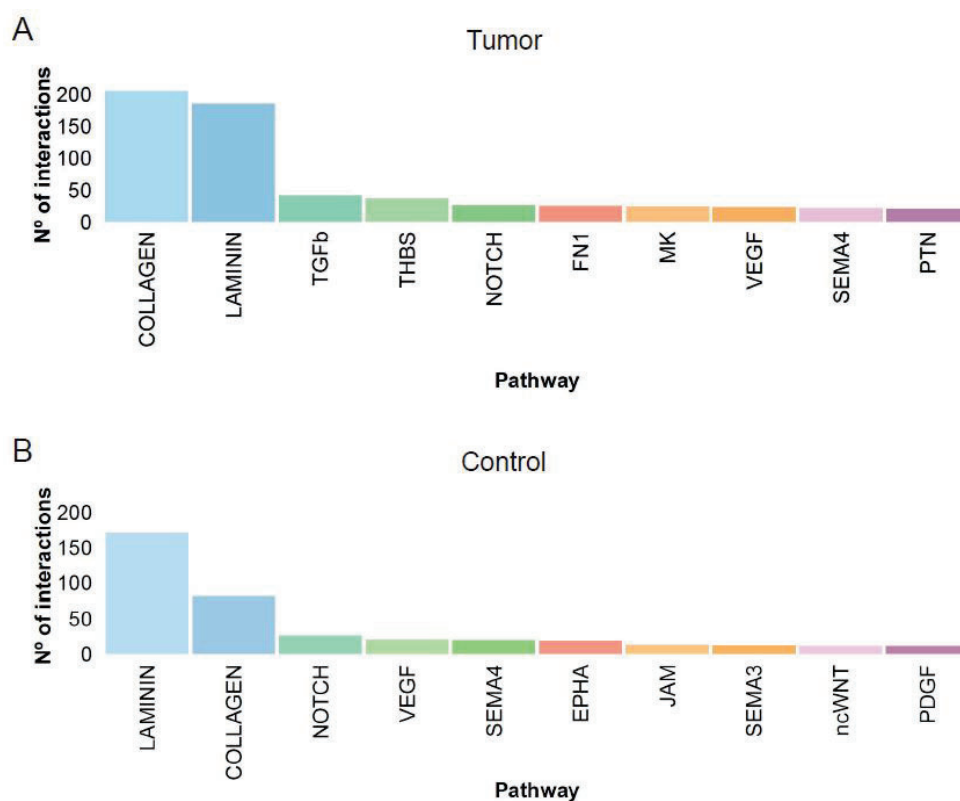


Figura R 16. La vía de señalización de TGF- β es exclusiva de las células murales tumorales

Número de veces que interacciona una vía de señalización sobre las células murales en condiciones (A) tumorales y (B) control.

La vía de señalización de TGF- β está descrita como una de las implicadas en la transformación de fibroblastos a fibroblastos asociados al cáncer (131), entre otras funciones a lo largo de la carcinogénesis y la metástasis. Teniendo en cuenta esta información, se valoró la posibilidad de que TGF- β pudiese estar afectando de una forma similar en los pericitos. Para completar y validar la presencia de TGF- β en el análisis de interacciones, se buscó una firma que determinaba un fenotipo de activación por TGF- β , la cual se obtuvo del artículo *Calon et al. 2015*. Se analizó la expresión de dicha firma en las diferentes poblaciones, tanto en controles como en tumores, y se detectó que las células murales eran las que tenían el mayor fenotipo de activación por TGF- β . Con el interés de conocer la afectación a nivel tumoral, se separaron los datos por fenotipo y se observó que las células murales procedentes de las muestras tumorales tenían mayor activación por TGF- β (**Figura R 17**). Considerando el análisis de interacciones y el del fenotipo de activación por TGF- β , se hipotetizó que TGF- β podría ser la vía de señalización que estaba provocando el cambio de entidad en pericitos.

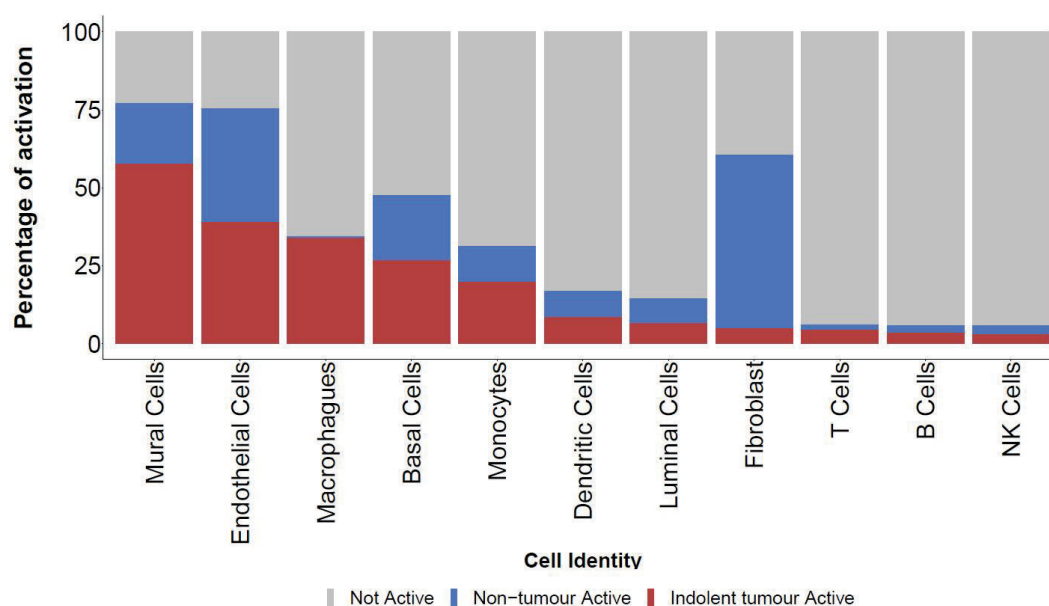


Figura R 17. Las células murales tumorales tienen los valores más elevados de fenotipo de respuesta a TGF- β

Porcentaje de fenotipo de respuesta a TGF- β en los diferentes tipos celulares ordenados según el valor de las muestras tumorales.

La vía de señalización TGF- β consta de una proteína dimérica con 3 isoformas nombradas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 que interaccionan con tres receptores: TGF- β R1, TGF- β R2 y TGF- β R3. Generalmente, la proteína TGF- β se une a hetero-tetrámeros de

TGF- β RI/ TGF- β RII que contienen proteínas quinasa en el dominio citoplasmático (99). Conociendo la base biológica de la vía, se estudió la expresión de los tres receptores en los dos fenotipos de células murales (**Figura R 18**). Respecto a las muestras tumorales, la expresión del TGF- β R1 mostraba un incremento leve, el TGF- β R2 aumentaba y, por el contrario, el TGF- β R3 disminuía. Estos datos sugieren que el fenotipo tumoral afecta diferencialmente a la presencia de los diferentes receptores

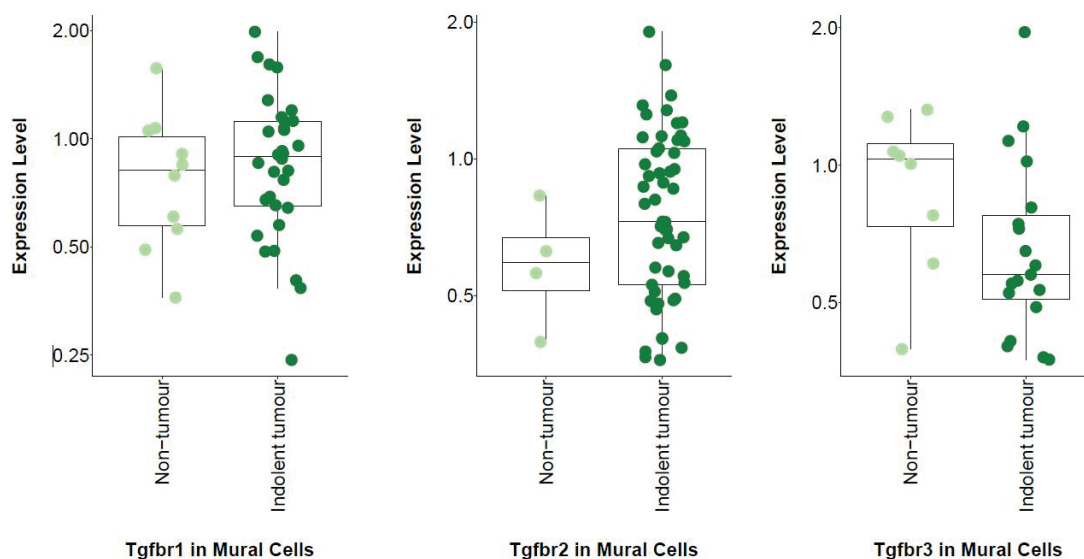


Figura R 18. La expresión de los receptores de TGF- β es diferente según la isoforma del receptor y el fenotipo de las células murales

Expresión de TGF- β R1, 2 y 3 por tipo fenotipo en las células murales representada con *box plots*.

2.2. Los datos humanos validan la importancia de TGF- β en las células murales tumorales

Los prometedores resultados obtenidos del *scRNAseq* de muestras murinas estaban limitados por el número de células obtenidas. Por este motivo se decidió validar el fenotipo de activación de TGF- β descrito en los model murinos mediante datos públicos de *scRNAseq* de muestras humanas de cáncer de próstata. Para ello se eligieron cinco artículos (**Tabla M 8**) que incluían biopsias de próstatas control y tumorales (PCa). Se obtuvieron un total de 14.629 células mesenquimales tras realizar una corrección batch effect para evitar la distribución heterogenia debido a los diferentes métodos de secuenciación y, finalmente, identificar y los diferentes grupos celulares mediante marcadores canónicos. Dichos marcadores y el completo procesado de las bases de datos con Seurat se encuentran detallados en **Materiales y métodos**. Se seleccionaron únicamente células mesenquimales debido a que el objetivo era validar la importancia

de TGF- β en las células murales. Se identificaron 3 grupos de células mesenquimales: células murales, células endoteliales y fibroblastos (**Figura R 19**).

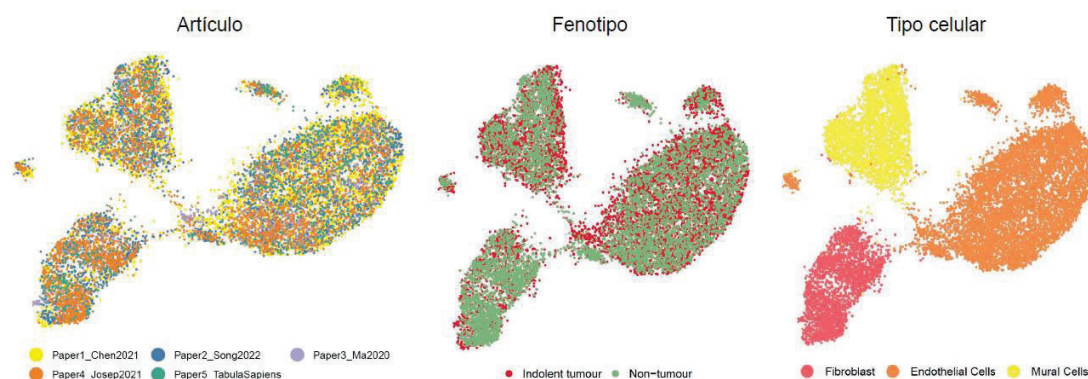


Figura R 19. Clasificación de las células mesenquimales de los *datasets* humanos

Aproximación y Proyección de Variedad Uniforme (UMAP) de 14629 células individuales. Tres clústeres de células mesenquimales identificados a través de la clusterización e indicados por colores.

Tras agrupar las células obtenidas de las bases de datos, se valoró si el número de células y la proporción entre control y tumor era óptimo para reforzar los datos murinos obtenidos previamente. De las 14.629 células mesenquimales procesadas, se consiguieron 3.414 células murales de las cuales 1.384 eran control y 2.030 eran tumorales (**Figura R 20**). El incremento total de células y el equilibrio entre ambos fenotipos fortalecía el uso de las bases de datos humanas como validación.

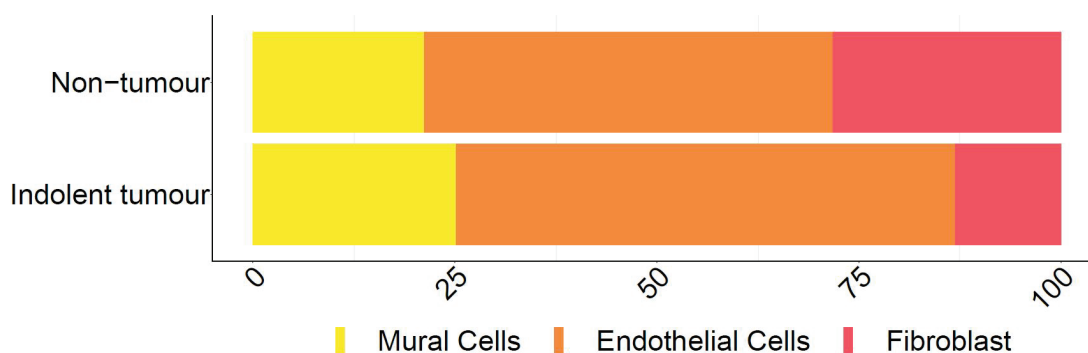


Figura R 20. La proporción de células murales está equilibrada entre control y tumor

Distribución de la composición celular por fenotipo.

Habiendo incrementado el número de células murales totales y por fenotipo, se procedió a estudiar la expresión de desmina en los grupos. Al igual que en los datos murinos, las células murales eran las que expresaban más desmina comparado con fibroblastos y endoteliales. Además, se mostraba que la expresión en células murales

tumorales disminuía respecto al control (**Figura R 21**), en coherencia con la caracterización realizada previamente tanto en muestras murinas como humanas.

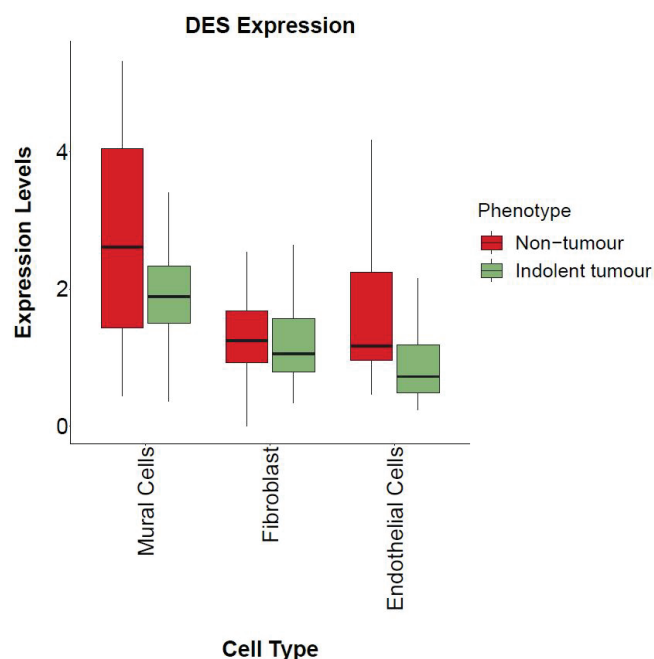


Figura R 21. La expresión de desmina disminuye en las muestras tumorales

Expresión de desmina por tipo celular y fenotipo ordenados de mayor a menor expresión y representada con *box plots*.

Como el objetivo era validar el fenotipo de respuesta de activación por TGF- β de las células murales tumorales en muestras murinas, se realizó el mismo análisis en los datos humanos. En coherencia con los resultados anteriores, se vio las células murales tumorales tenían mayor activación por TGF- β que el control (**Figura R 22**). Este dato apoyaba y reforzaba las conclusiones obtenidas en los análisis de los modelos murinos.

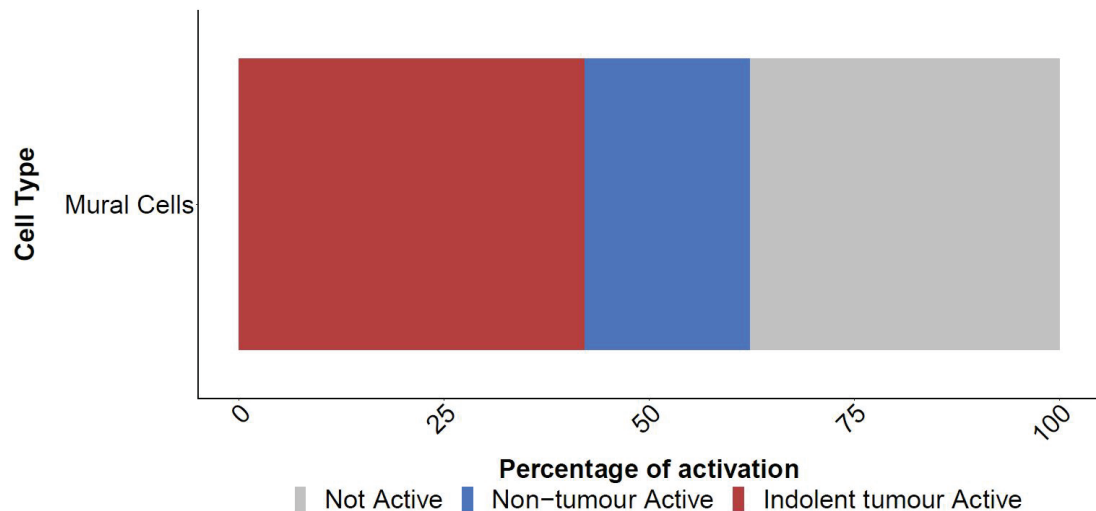


Figura R 22. Las células murales tumorales tienen mayor fenotipo de respuesta a TGF- β que las células murales control

Porcentaje de fenotipo de respuesta a TGF- β en los diferentes tipos celulares ordenados según el valor de las muestras tumorales.

Finalmente, también se analizó la expresión de los receptores de TGF- β en los datos de *scRNAseq* de las muestras humanas. Tal y como muestras la **Figura R 23**, la expresión de los tres receptores tiene una tendencia de incremento en el fenotipo tumoral humano.

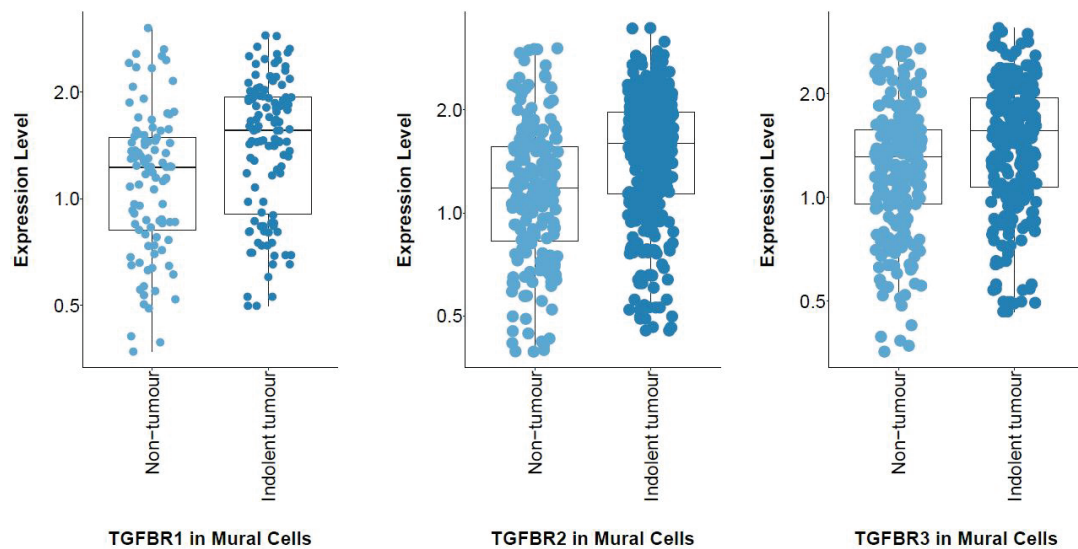


Figura R 23. La expresión de los receptores de TGF- β incrementa en las tres isoformas en las células murales tumorales

Expresión de TGF- β R1, 2 y 3 por tipo fenotipo en las células murales representada con *box plots*.

2.3. Los pericitos tratados con TGF- β *in vitro* pierden expresión de desmina y ganan expresión en marcadores fibroblásticos

Los análisis murinos y humanos de *scRNAseq* sugerían que la vía de señalización TGF- β podía ser el mecanismo que controlase el cambio molecular de los pericitos. Con el objetivo de conocer la influencia de TGF- β en los pericitos, se diseñaron diferentes ensayos *in vitro* realizados con cultivos de pericitos primarios de cerebro de ratón. Se eligió el cerebro debido a que es uno de los tejidos más vascularizados del organismo y con mayor presencia de pericitos. Las células aisladas se validaron como pericitos comprobando la expresión proteica de marcadores específicos de pericitos en cerebro (Figura R 24). Se usaron células endoteliales como control.

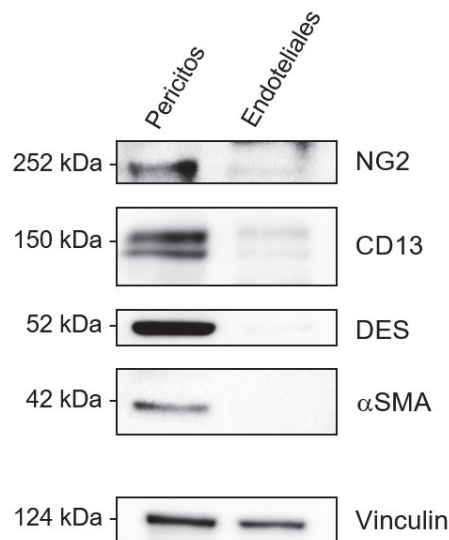


Figura R 24. Los pericitos de cerebro aislados tienen un patrón de expresión proteico específico

Expresión proteica de marcadores de pericitos (Ng2, Cd13, Des, α SMA) usando células endoteliales como control.

Tras conseguir pericitos *in vitro*, se diseñó un ensayo con tratamiento de TGF- β . La isoforma TGF- β 1 fue elegida ya que está descrita como un biomarcador del cáncer de próstata ya que está asociada su alta expresión a mal pronóstico en muestras murinas y humanas y en ensayos *in vitro* e *in vivo* (109,110), además de angiogénesis y metástasis (64,111).

Lo primero que se hizo fue comprobar la respuesta de los pericitos a la activación canónica de TGF- β 1, es decir, la activación mediante la fosforilación de SMAD2/3. Para ello, se trataron los pericitos con TGF- β 1 durante 24h y se analizó la activación de la vía

de señalización utilizando el marcador pSMAD3. Tal y como se muestra en la **Figura R 25**, las células tratadas responden a TGF- β 1 fosforilando SMAD3.

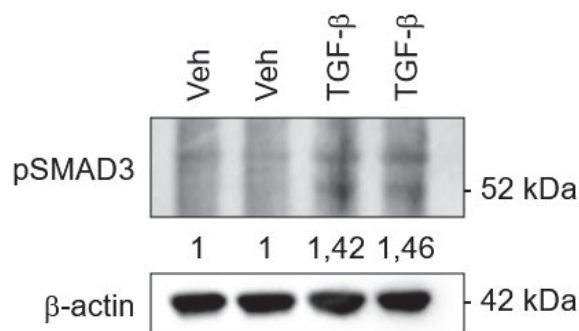


Figura R 25. El tratamiento con TGF- β 1 activa pSMAD3 en los pericitos

Expresión proteica de pSMAD3 en pericitos tratados con TGF- β 1.

Además, se observó un cambio morfológico en los pericitos tratados respecto de los no tratados. Como se puede ver en la **Figura R 26**, la activación de la vía de señalización de TGF- β otorgó una forma elongada similar a la de los fibroblastos.

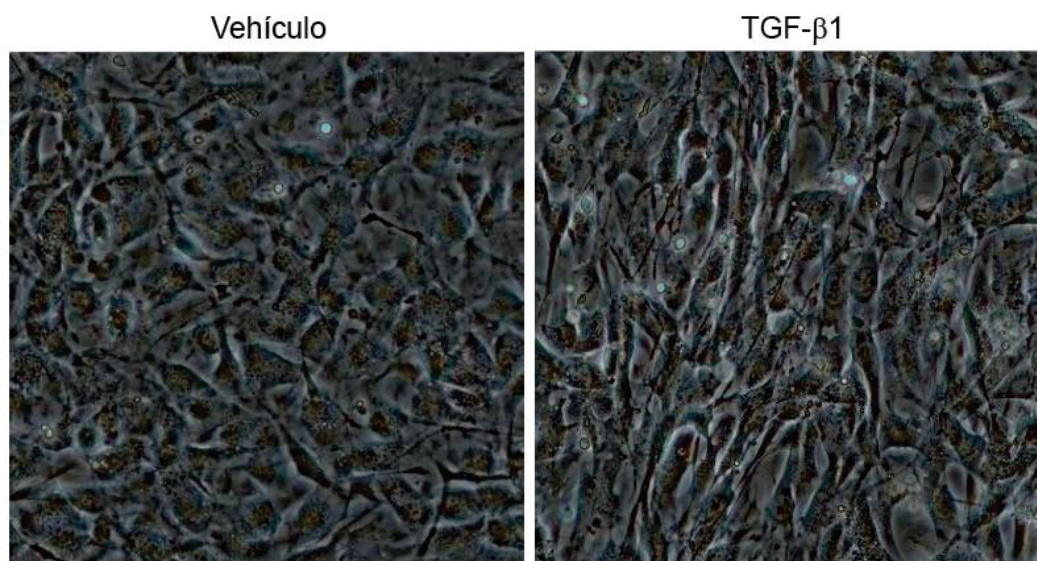


Figura R 26. El tratamiento de TGF- β 1 modifica la morfología de los pericitos *in vitro*

Representación de la morfología celular observada en los pericitos cultivados *in vitro* a las 24h de ser tratados con TGF- β 1.

Esta describe la regulación de la expresión de genes de vSMC mediante TGF- β 1 y la fosforilación de Smad2/3 (70), por ello se decidió estudiar la activación transcriptómica de diferentes marcadores de pericitos y fibroblastos. Se usó *Cthrc1* para validar la

activación de la vía, que se confirmó al detectar el incremento de expresión en los pericitos tratados (**Figura R 27**).

Al observar el comportamiento de *Des*, se vio una disminución respecto al vehículo. Analizando el resto de marcadores de pericitos y fibroblastos, no todos responden igual a TGF- β 1. Los marcadores de pericitos *Cd248*, *Ng2*, *Pdgfrb* y *Rgs5* no variaban con el tratamiento, en cambio *Anpep* también disminuía como *Des*. Por otro lado, los marcadores de fibroblastos *Acta1* y *Acta2* presentan un aumento de expresión, *Fsp1* la pierde y *Fap*, *Twist*, *Vim* se mantuvieron sin cambios (**Figura R 27**). Este comportamiento variable entre marcadores sugiere un cambio de entidad en los pericitos sin demostrar una transformación total ya que no hay un grupo de marcadores modificados que sea predominante al resto.

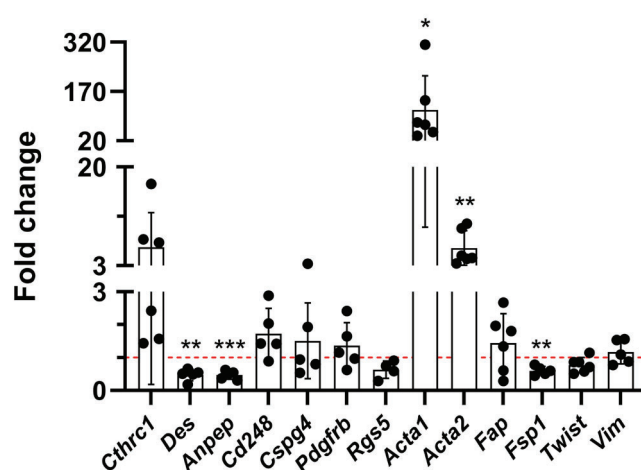


Figura R 27. La activación de TGF- β influye en la expresión de desmina y otros marcadores relacionados con pericitos y fibroblastos

Expresión relativa de genes relacionados con pericitos y fibroblastos tras tratar los pericitos con TGF- β 1, analizados mediante qPCR. n = 5-6. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba One sample t test. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.0001 se consideraron estadísticamente significativos.

Finalmente, tras ver la pérdida de desmina a nivel de ARN, se analizó la expresión proteica y se detectó una pérdida de expresión (**Figura R 28**), la cual es coherente con los resultados anteriores.

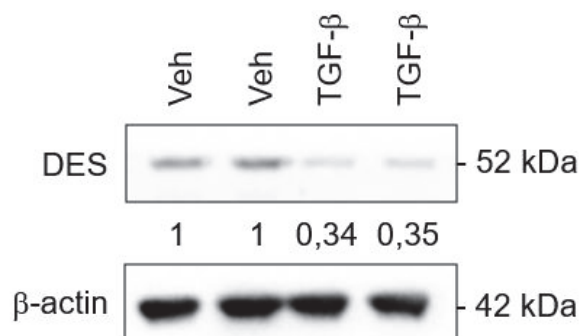


Figura R 28. El tratamiento con TGF-β1 disminuye desmina en los pericitos

Expresión proteica de DES en pericitos tratados con TGF-β1.

Los complejos análisis *in silico* y las validaciones *in vitro* confirman que la vía de señalización de TGF-β provoca un cambio de identidad en los pericitos y afecta negativamente a la expresión de desmina. Conociendo la importancia de estas células en los vasos sanguíneos, la siguiente cuestión planteada fue descubrir y evaluar las propiedades vasculares afectadas tras las modificaciones en su cobertura.

3. La funcionalidad del vaso se ve afectada por la pérdida de desmina en los vasos sanguíneos

3.1. La contractilidad vascular está afectada negativamente por la modificación de los pericitos

Los pericitos interaccionan con las células endoteliales para controlar muchas funciones vasculares como contractilidad y permeabilidad, entre otros (63,82). Para identificar si TGF-β afecta dichas funciones de una manera sin condicionamiento, se decidió hacer un análisis transcriptómico comparando pericitos no tratados y tratados con TGF-β1. Se buscaron las vías de señalización o términos enriquecidos en *Gene Ontology* (GO) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) modificadas debido al tratamiento. Los resultados mostraban un enriquecimiento en vías relacionadas con la angiogénesis y, a la vez, una pérdida de contracción vascular en los pericitos tratados (**Figura R 29**).

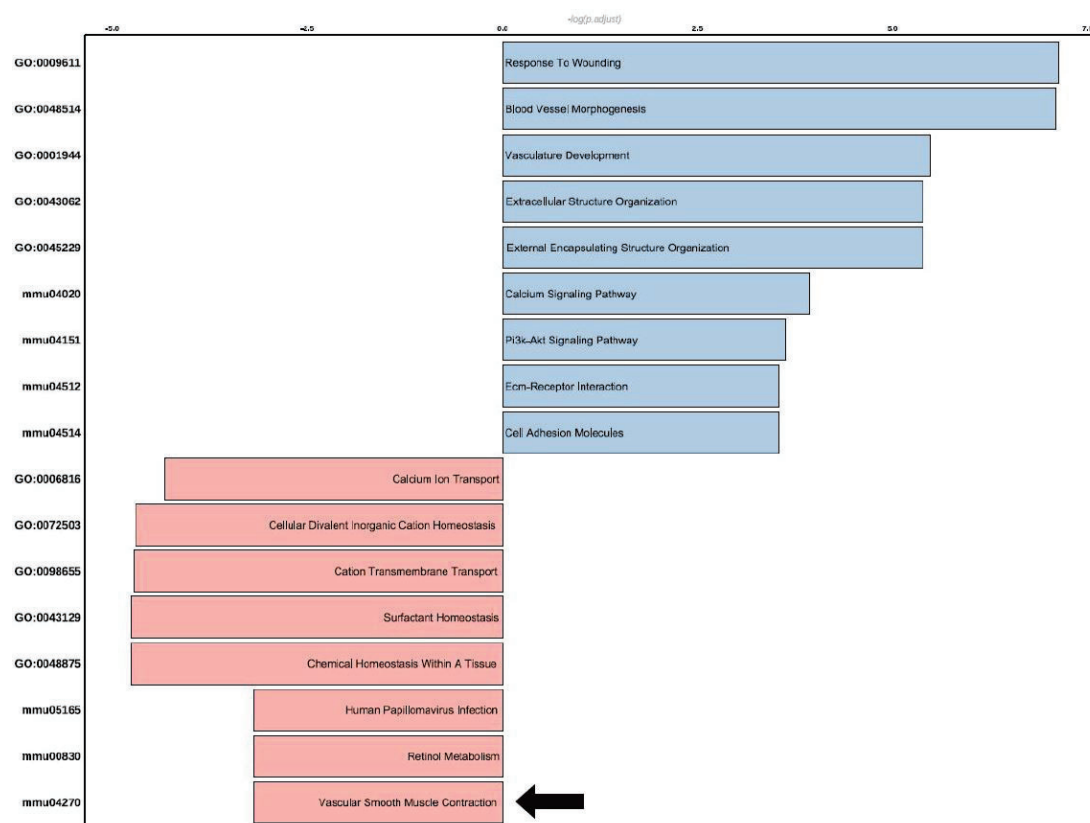


Figura R 29. La vía de señalización de TGF- β reduce la contracción de células musculares lisas en vasos sanguíneos

Análisis de *Gene Ontology* (GO) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) de programas transcripcionales aumentados (azul) y disminuidos (rojo) en pericitos tratados con TGF- β 1. Todos tienen $p < 0.05$ y están ordenados de más significativo a menos.

Como análisis complementario a la transcriptómica, se ejecutó un estudio *in silico* usando datos procedentes del CancerTool. En la **Sección 1.1.** se describió desmina como un gen que pierde su expresión con la progresión tumoral y, dicha pérdida, correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad (**Figuras R 1 y R 2**). En este estudio se consideraron los genes que correlacionaban positivamente con desmina en pérdida de expresión y mal pronóstico. Con estas restricciones se obtuvo una lista de 69 genes (**Figura R 30A**). Al analizar las vías GO y KEGG relacionadas con estos genes, la contractilidad vascular una de las funciones representadas (**Figura R 30B**) y la única que coincidía con las listadas en el análisis transcriptómico mostrado en la **Figura R 29**. Además, al observar detenidamente los 69 genes que correlacionaban con desmina, se detectaron algunos comúnmente identificados como genes de contractilidad, por ejemplo, MYH11 y MYLK (**Figura R 30C**).

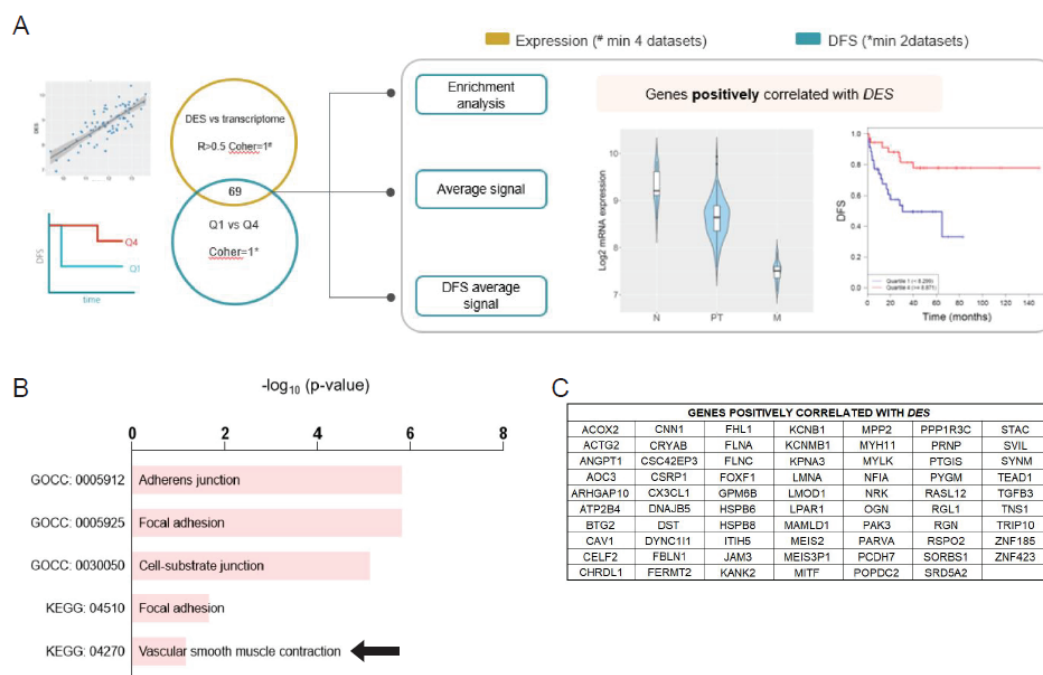


Figura R 30. La contracción de células musculares lisas en los vasos sanguíneos se ve afectada por la progresión tumoral

(A) Venn diagram mostrando el número de genes que correlacionan directamente con desmina. (B) Análisis de Gene Ontology (GO) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) de programas transcripcionales enriquecidos en los genes que correlacionan directamente con desmina. (C) Genes que correlacionan directamente con desmina.

Los datos del análisis transcriptómico mostraban la contractilidad vascular como una función afectada negativamente por el tratamiento de TGF- β 1. A su vez, los análisis *in silico* mediante el CancerTool la mostraban como una función relacionada con los 69 genes que compartían el comportamiento de desmina en situación tumoral. Es decir, la contractilidad vascular empeoraba con la progresión del tumor. Tras observar estos resultados, se decidió validar los datos en los modelos murinos modificados genéticamente de PCa: Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{flx/flx}) y Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flx/WT};LKB1^{flx/flx}).

Se eligió el marcador de contractilidad MYH11 para las IF debido a su habitual uso en estos ensayos y, más concretamente, porque era uno de los que aparecía en nuestro listado de genes que correlacionaban con desmina. De esta manera el resultado de los análisis de expresión de MYH11 permitía validar los resultados *in silico* respecto al comportamiento del marcador y respecto la función de contractilidad *per se*.

La próstata es un órgano glandular como ya se ha definido previamente, esto informa y anticipa que la expresión de genes contráctiles se encontrará entorno a las glándulas además de en los vasos (15,16). La expresión de MYH11 por IF confirma este hecho al detectar expresión del marcador en zonas perivasculares y glandulares (**Figura R 31A**).

Teniendo en cuenta la localización de los pericitos como se ha llevado a cabo en otras secciones, se analizó la expresión en la cobertura vascular y se comprobó que hay una pérdida relacionada con la metástasis (**Figura R 31B**). Estos datos afirman que la pérdida de contractilidad vascular debe a la progresión tumoral.

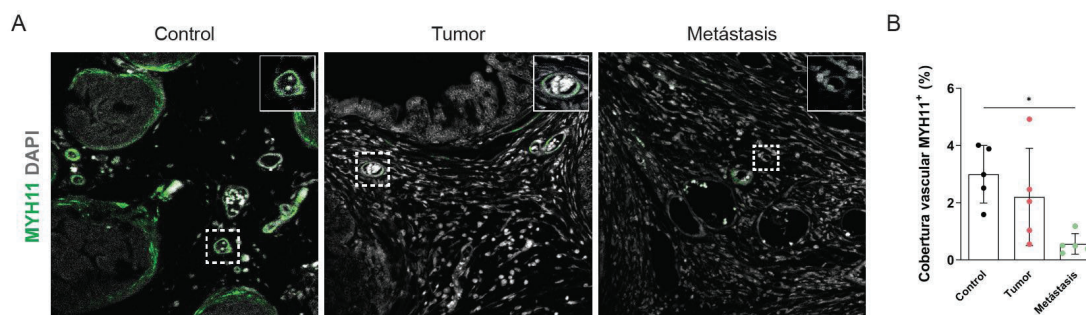


Figura R 31. La expresión de MYH11 en la cobertura vascular disminuye con la metástasis

(A) Imágenes representativas de próstatas Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}) y Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT}; LKB1^{flox/flox}) teñidas para MYH11 (verde). (B) Cuantificación del área positiva de MYH11 en la cobertura del vaso sanguíneo. $n = 5$. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Kruskal-Wallis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

Tras esta caracterización inicial, se determinó la expresión de este gen de contractilidad en pericitos *in vitro* tratados con TGF- β 1. Se observó una tendencia a la pérdida de expresión de ARN de MYH11 a las 48h (**Figura R 32**). Estos resultados irían en coherencia con los mostrados en la **Figura R 31B** donde la pérdida más acusada de expresión se da en tiempos más prolongados en condiciones con mayor progresión tumoral y, posiblemente, mayor presencia de TGF- β .

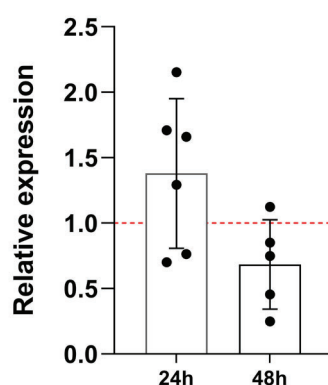


Figura R 32. La activación de TGF- β reduce la expresión de MYH11 *in vitro*

Expresión relativa de MYH11 tras tratar los pericitos con TGF- β 1, analizada mediante qPCR. $n = 5-6$. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba One sample t test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ se consideraron estadísticamente significativos.

El conjunto de resultados obtenidos mediante la caracterización por IF y el tratamiento con TGF- β 1 determina que la contractilidad vascular se ve afectada por la agresividad del tumor.

3.2. El lumen vascular se incrementa con la progresión de tumor

Otra de las funciones que se característcas de los vasos tumorales es el incremento del lumen vascular, el cual se asocia a pérdida de contractilidad y a disfuncionalidad de las células que conforman los vasos sanguíneos. Al analizar el lumen vascular en los modelos murinos, se confirmó que el incremento progresivo del lumen con la agresividad del tumor (**Figura R 33**).

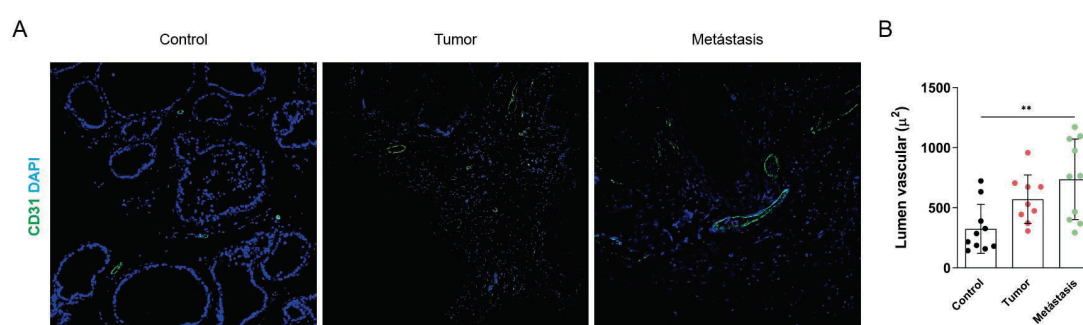


Figura R 33. El incremento de lumen vascular es una característica de la pérdida de contractilidad vascular

(A) Imágenes representativas de próstatas Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{flox/flox}) y Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{flox/WT};LKB1^{flox/flox}) teñidas para CD31 (verde). (B) Cuantificación del lumen de los vasos sanguíneos. n = 9-10. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Kruskal-Wallis. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.0001 se consideraron estadísticamente significativos.

3.3. La agresividad del tumor produce una afectación en los pericitos promoviendo la extravasación

La permeabilidad vascular también se ve afectada por la disfuncionalidad vascular durante la carcinogénesis y la metástasis. Los vasos con mayor permeabilidad producen mayor facilidad de extravasación, lo cual es un factor importante para la colonización de nichos metastáticos. Debido a la importancia de esta función en la propagación de la enfermedad, se decidió estudiar la permeabilidad de los vasos sanguíneos.

El estudio de la extravasación en los modelos murinos se realizó analizando la expresión del marcador de eritrocitos Ter119. El patrón de expresión de Ter119 en los ratones control se encontraba localizado en el lumen de los vasos sanguíneos; por el contrario, en las muestras tumorales se detectaron eritrocitos en el tejido prostático fuera

de los vasos (**Figura R 34A**). Además, la extravasación de eritrocitos se incrementaba con la agresividad tumoral (**Figura R 34B**).

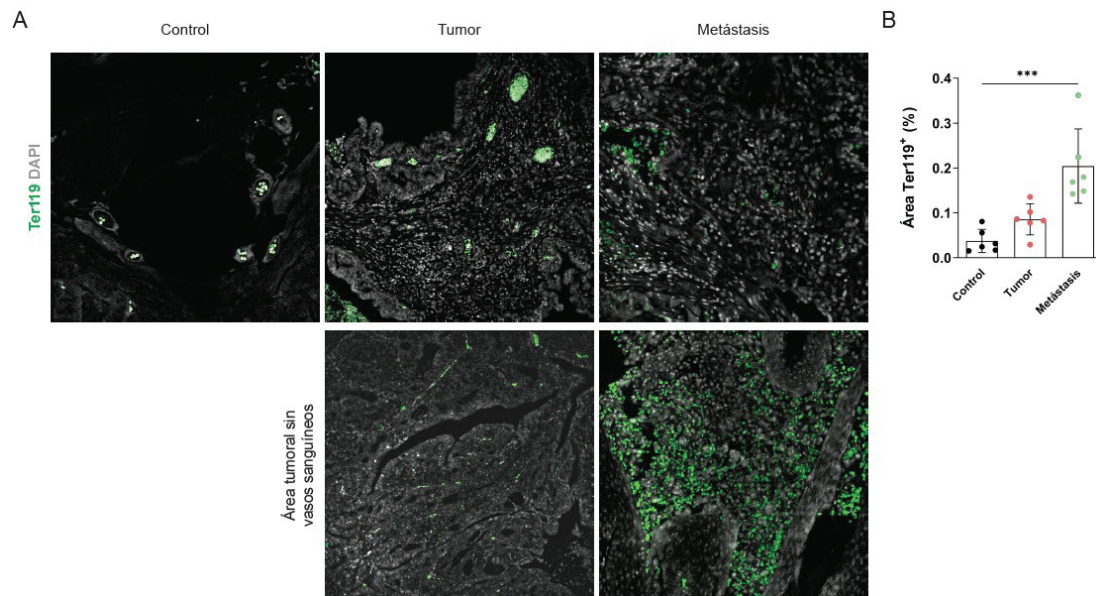


Figura R 34. El aumento de la extravasación de eritrocitos es una característica de la afectación vascular debido al tumor

(A) Imágenes representativas de próstatas Control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}), Tumor (Pb-Cre-PTEN^{fllox/fllox}) y Metástasis (Pb-Cre-PTEN^{fllox/WT};LKB1^{fllox/fllox}) teñidas para Ter119 (verde). (B) Cuantificación del área positiva de Ter119 fuera del vaso sanguíneo. n = 6. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de múltiple comparación Kruskal-Wallis. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.0001 se consideraron estadísticamente significativos.

Los análisis de contractilidad y extravasación confirmaron la afectación en la funcionalidad vascular, no solo provocada por la presencia del tumor, sino también por la influencia de la vasculatura tumoral disfuncional.

4. El inhibidor de TGF- β *in vitro* favorece la recuperación de desmina y otros marcadores a sus estados basales

La finalidad de este proyecto es poder devolverles a los pericitos su identidad inicial y ver cómo afecta esto a la agresividad del tumor. Para ello se han realizado ensayos *in vitro* y diseñado dos modelos ortotópicos que se han caracterizado y validado como alternativas óptimas para el estudio del inhibidor de TGF- β (**Sección 1.5**).

Un testeo inicial del inhibidor *in vitro* es fundamental para las decisiones posteriores respecto al planteamiento y ejecución del ensayo *in vivo* en los modelos ortotópicos. El ensayo *in vitro* se realizó con los cultivos primarios de pericitos murinos aislados de cerebro (descritos en la **Sección 2.3**), los cuales fueron tratados con el inhibidor SIS3 que es específico para la fosforilación de Smad3 (proteína activada por la presencia de TGF- β). Este inhibidor no afecta a otros componentes *downstream* de TGF- β como Smad2 o a vías de señalización relacionadas como MAPK, ERK o PI3K.

Primero se comprobó si había rescate fenotípico en *Cthrc1*, marcador que permite valorar la activación por TGF- β . Al observar una disminución de *Cthrc1* en los pericitos tratados con inhibidor, podemos confirmar que el tratamiento funciona (**Figura R 35**).

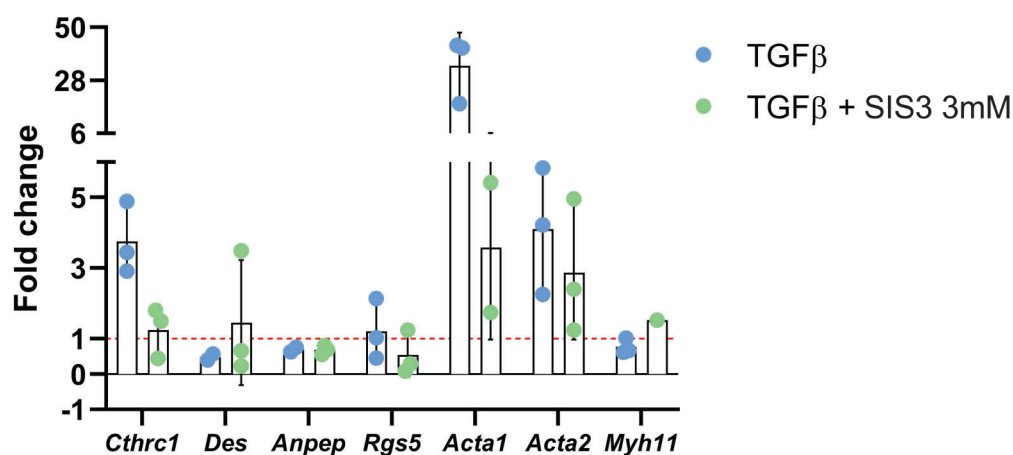


Figura R 35. La expresión de desmina tiene una tendencia a recuperar su estado basal tras el tratamiento con el inhibidor de TGF- β

Expresión relativa de genes relacionados con pericitos y fibroblastos tras tratar los pericitos con TGF- β 1 y/o el inhibidor de TGF- β -R (SIS3), analizados mediante qPCR. n = 2-3. Los datos representados corresponden a los valores promedio. Las barras de dispersión corresponden al S.E.M. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba Kruskal-Wallis. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.0001 se consideraron estadísticamente significativos.

A continuación, se analizaron 3 marcadores de pericitos (*Des*, *Anpep* y *Rgs5*), 2 marcadores de fibroblastos (*Acta1* y *Acta2*) y un marcador de contractilidad (*Myh11*). Estos marcadores se escogieron por estar modificados en el ensayo *in vitro* de pericitos tratados con TGF- β 1 (*Des*, *Anpep*, *Rgs5* y *Myh11* perdían expresión, mientras que *Acta1* y *Acta2* la ganaban). Al tratar los pericitos con el inhibidor SIS3 se mostraron tendencias de recuperación del fenotipo basal en *Des*, *Acta1*, *Acta2* y *Myh11* (**Figura R35**). Esto sugiere que TGF- β controla la expresión de estos genes en pericitos mediante la vía canónica de la vía de señalización la cual se activa mediante la fosforilación de SMAD3.

Con los resultados obtenidos del ensayo *in vitro*, se consideró que se podía iniciar el ensayo *in vivo* con los modelos ortotópicos para realizar el estudio de rescate.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La relevancia de los pericitos como componente del microambiente tumoral y sus contribuciones en la progresión del cáncer han estado subestimadas durante mucho tiempo. Esta creencia se ha debido principalmente a la promiscuidad de los marcadores usados para su detección y a la comprensión generalizada de que la vasculatura tumoral carece de pericitos. En los últimos años el estudio de pericitos está incrementando, sobre todo, en condiciones patológicas. Aun así, el papel de los pericitos en el cáncer de próstata es totalmente desconocido.

En este estudio, se busca caracterizar los pericitos en el cáncer de próstata, en particular en su implicación en la progresión tumoral. Se ha demostrado que los pericitos sufren cambios en su perfil molecular que repercute en la correcta funcionalidad de los vasos sanguíneos.

Por otra parte, se ha estudiado el mecanismo biológico que provocan modificaciones en el fenotipo de los pericitos. Gracias al uso de diferentes técnicas *in silico*, se sugiere que la vía de señalización TGF- β está afectando a los pericitos en condiciones tumorales. Las validaciones *in vitro* demuestran que TGF- β provoca alteraciones en diferentes marcadores canónicos definiendo un fenotipo patológico en pericitos.

El objetivo final del proyecto es realizar un rescate del fenotipo mediante inhibidores de TGF- β , tanto *in vitro* como *in vivo*. La inhibición de la vía canónica de TGF- β devuelve a los pericitos *in vitro* niveles basales de los marcadores. Además, se está generando un modelo murino ortotópico que permita validar la recuperación *in vivo*.

Como se ha mencionado en anteriores ocasiones, a nivel molecular no existe un marcador exclusivo de pericitos (83–85) lo que dificulta su identificación en tejidos poco estudiados como la próstata. Las técnicas *in silico* están siendo usadas para la exploración y experimentación de procesos biológicos mediante análisis computacionales. Considerando esta información, el uso de la herramienta bioinformática CancerTool fue el punto de partida para seleccionar el candidato más óptimo como marcador de pericitos en próstata. Esta herramienta recoge datos humanos que permiten entender el comportamiento de expresión de genes y la relación de estos con la agresividad y la supervivencia libre de enfermedad.

Se eligieron marcadores canónicos de pericitos (*Desmin*, *Anpep*, *Cd248*, *Cspg4*, *Pdgfrb* y *Rgs5*) en otros tejidos para valorar su comportamiento en el PCa. El

comportamiento de *Desmin* muestra una pérdida de expresión con la progresión tumoral y un peor pronóstico por dicha pérdida. Se incluyó un marcador de células endoteliales (*Pecam1*) en el análisis con el objetivo de validar los resultados. Como se esperaba, la expresión de *Pecam1* incrementa con la progresión provocando un peor pronóstico, datos coherentes con el incremento de la angiogénesis tumoral. Los resultados obtenidos mediante CancerTool (i) sugieren que *Desmin* es el marcador más óptimo para caracterizar pericitos en PCa, (ii) muestra un incremento de la expresión de *Pecam1* coherente con proceso de angiogénesis tumoral (60) y (iii) define *Pecam1* como un buen marcador para validar la herramienta.

El uso del CancerTool es informativo para tener un conocimiento base sobre los marcadores de interés en cáncer de próstata. Aun así, hay que considerar las limitaciones de la herramienta: son bases de datos procedentes de muestras humanas las cuales pueden proporcionar resultados ligeramente diferentes a los murinos y los resultados *in silico* obtenidos necesitan validación experimental.

Otra técnica que está siendo fundamental en el estudio de enfermedades como el cáncer, sobre todo en cuanto a la caracterización del microambiente tumoral, es el *scRNAseq* (83–85). Esta avanzada técnica de secuenciación permite investigar el desarrollo del tejido, la heterogeneidad celular y la respuesta celular en condiciones patológicas. La realización de la técnica de *scRNAseq* tiene como objetivos principales (i) la identificación de tipos celulares poco descritos o posibles estadios celulares patológicos en condiciones tumorales y (ii) el descubrimiento de un mecanismo que regule el cambio de identidad de los pericitos.

En este estudio se procesaron muestras de los modelos murinos control (Pb-Cre-PTEN^{WT/WT}) y tumor (Pb-Cre-PTEN^{fllox/fllox}) debido a que la pérdida de desmina se produce con el inicio de la carcinogénesis. Como validación de los resultados obtenidos durante la caracterización, se comprobaron los grupos en los que se expresaba desmina y, posteriormente, como se modificaba esta expresión entre fenotipos. Se observó que desmina se expresa, al igual que en la caracterización por IF de muestras murinas, en 2 grupos: células murales y fibroblastos. Si se miran detalladamente los fenotipos, hay una pérdida de expresión en el grupo de fibroblastos y valores similares en células murales.

Aunque los pericitos, en general, están pobremente definidos debido a la falta de marcadores canónicos universales que puedan identificarlos (132), la mayor limitación en este estudio se debe a las dificultades técnicas para obtener las células. Los pericitos son una población subrepresentada en los tejidos. Siendo células escasas *per se*, es

posible que el procesamiento de la muestra mediante 10X Genomics Platform sea poco eficiente para pericitos y esto dificulte su obtención. En *Salcher et al. 2022* se comparan diferentes protocolos de procesamiento de *scRNAseq* para la caracterización de neutrófilos y determinaron que 10X Genomics es la plataforma que menor cantidad celular obtiene (133). La carencia de neutrófilos que se ha mencionado podría ser un ejemplo de la ineficacia de 10X Genomics con algunas poblaciones poco abundantes como los pericitos.

La mayor novedad en este estudio es usar el *scRNAseq* para la caracterización a alta resolución de los estadios de diferenciación, desarrollo y heterogeneidad celular en próstata. La aplicación del *scRNAseq* en el cáncer de próstata durante los últimos años se ha limitado a células tumorales circulantes y líneas celulares inmortalizadas. Está limitada representación de tumores humanos y la falta de perfiles del microambiente tumoral deja en gran parte desconocida la heterogeneidad transcriptómica intratumoral del cáncer más común en los hombres (52). Es por ello que se decidió estudiar el comportamiento fenotípico de las células murales en situación tumoral para descubrir que mecanismo estaba implicado la alteración de dichas células.

Con este objetivo, se realizó un análisis de probabilidades de interacción de vías de señalización considerando las células murales como las células diana. De esta manera, se observa que TGF- β es la vía con mayor probabilidad de número de interacciones y es exclusiva de las células murales tumorales. Para completar el estudio, se realizó un segundo análisis el cual mostraba si la célula diana tenía una firma de fenotipo de respuesta activa a TGF- β , la cual se obtuvo de *Calon et al. 2015*. La firma determina que las células murales tienen la mayor respuesta de activación por TGF- β y que, concretamente, las procedentes de tumores son las más activas. Si unificamos ambos análisis, estos sugieren que la vía de señalización de TGF- β afecta a las células murales y lo hace con mayor actividad en condiciones tumorales.

La vía de señalización TGF- β es prometedora como mecanismo modificador de pericitos ya que se conoce su influencia en la activación de CAFs (43) o promoviendo marcadores de vSMC (70). Aun así, debido a las limitaciones mencionadas anteriormente, era necesaria una validación que corroborase los datos obtenidos. En los últimos años, el análisis de muestras humanas por *scRNAseq* ha permitido validar resultados de *scRNAseq* obtenidos en modelos animales (134) e, incluso, crear atlas de caracterizaciones celulares (135). Además, el uso de bases de datos públicas de *scRNAseq* se ha vuelto una estrategia común para caracterizar diferentes grupos celulares en una amplia variedad de órganos (136,137).

En este proyecto, se decidió usar las cinco bases de datos públicas sobre próstata humana, tanto tejido normal o tumoral (52,138–141), para realizar una validación externa de los resultados obtenidos sobre la vía de señalización de TGF- β en células murales murinas. El análisis de las bases de datos públicas permite balancear el número de células por fenotipo y, a su vez, incrementar el número total de células. De esta manera, se comprueba que en el grupo de células murales el fenotipo de respuesta a TGF- β es predominante en las tumorales. Estos resultados sugieren que TGF- β puede ser la vía de señalización que lidera el fenotipo patológico de los pericitos.

La combinación de análisis murinos y humanos propone la interesante posibilidad de que TGF- β sea la vía de señalización que controla cambio molecular de los pericitos. No obstante, estos resultados necesitan ser validados biológicamente para dilucidar si realmente TGF- β dirige y afecta a la cobertura vascular y, por ende, a los vasos sanguíneos.

La angiogénesis tumoral es uno de los procesos mejor descrito en condiciones cancerosas desde que en 1968 se descubrió la conexión entre tumor y vasos sanguíneos (10). El crecimiento del tumor provoca condiciones de hipoxia en el tejido, esta situación es la que promueve la liberación de agentes angiogénicos y, por ende, el desarrollo de la vasculatura (55,56,60). Además de permitir la oxigenación y nutrición del tumor (9), los vasos sanguíneos participan en la colonización de nichos metastáticos (8,9). Las células tumorales pueden viajar a través de los vasos gracias a la pérdida de funcionalidad de estos.

En condiciones tumorales, la vasculatura se vuelve irregular, tortuosa, desorganizada, dilatada y más permeable. Estas afectaciones están lideradas por disfuncionalidades en las células endoteliales y déficit en la cobertura vascular (9,58,59) promovidas por factores angiogénicos liberados por el tumor (5,9,10). En el cáncer de próstata, al igual que en otros muchos, el incremento de densidad vascular es un marcador angiogénico establecido que correlaciona con el crecimiento tumoral, los estadios de agresividad y la metástasis (60,64).

El estudio de la angiogénesis tumoral era fundamental para caracterizar los tumores de PCa en los modelos murinos y validar los resultados *in silico* procedentes del CancerTool. La alteración de *Pten* en el epitelio de la próstata provoca tumores primarios no invasivos, mientras que la alteración de ambos, *Pten* y *Lkb1*, da lugar a tumores primarios y metástasis. La angiogénesis tumoral se estudió mediante la expresión del marcador endotelial CD31 y este demuestra un crecimiento vascular progresivo acorde con el avance de la enfermedad. Estos resultados son coherentes con las características

descritas sobre la angiogénesis tumoral y su papel tanto en la carcinogénesis como en la progresión del tumor (5,9,10).

El tumor afecta a las células endoteliales y a las células murales y estas, a su vez, provocan cambios estructurales que promueven la invasión. Como se ha mencionado anteriormente, las células endoteliales están muy bien estudiadas en condiciones tumorales (58). Recientemente, se ha incrementado el interés por conocer en profundidad el papel de los pericitos en situaciones patológicas ya que, está descrita su pérdida o disfuncionalidad (83–85), pero no se conoce con exactitud el fenotipo patológico.

Los pericitos participan en procesos angiogénicos como el flujo de sangre, la coagulación o la permeabilidad vascular (75). Por otro lado, la vía de señalización TGF- β estimula la angiogénesis (113) y el desarrollo de células endoteliales y pericitos (70). Para conocer la afectación directa de TGF- β en las funciones de los pericitos, se realizó un análisis transcriptómico de pericitos *in vitro* con y sin tratamiento de TGF- β 1. Las funciones potenciadas por TGF- β están relacionadas con angiogénesis y ECM, mientras que la vía más afectada negativamente es la contracción vascular de células de músculo liso. Además, se recurrió de nuevo al CancerTool para buscar los genes que correlacionaban positivamente con desmina (pérdida de expresión y mal pronóstico) y las funciones relacionadas con dichos genes, entre las cuales aparece la contractilidad vascular. Tener una contractilidad vascular deficiente es coherente con las modificaciones funcionales que provoca el tumor. Los pericitos son células contráctiles que participan en la regulación del flujo sanguíneo mediante la contracción de los vasos sanguíneos (142).

El déficit de contractilidad visto *in silico* se validó en los modelos murinos de PCa mediante el marcador de contractilidad MYH11. La expresión de este marcador disminuye en la cobertura vascular con la progresión tumoral. También se corroboró la pérdida de MYH11 en pericitos *in vitro* tras ser tratados con TGF- β 1. Otra característica de los vasos disfuncionales con poca contractilidad, es la dilatación del vaso y, por consiguiente, el aumento del lumen vascular. Por ello se comprobó si este suceso se daba en los modelos estudiados y, efectivamente, el lumen de los vasos se incrementa con el avance de la enfermedad. Estos datos corroboran la afectación y disfuncionalidad vascular en los tumores de PCa analizados. Además, los resultados *in vitro* muestran que TGF- β regula la contractilidad de los pericitos.

Otra de las funciones vasculares que se suele ver afectada es la permeabilidad de los vasos sanguíneos, la cual se incrementa en condiciones tumorales (59). La

disfuncionalidad tanto de células endoteliales como pericitos afecta a la permeabilidad vascular promoviendo la invasión y colonización. El análisis del marcador de eritrocitos Ter119 confirma el aumento de la permeabilidad mostrando mayor extravasación cuanto más agresivo es el cáncer.

La carcinogénesis altera la estructura y funcionalidad de los vasos sanguíneos en el cancer de próstata. Además, los resultados sugieren que TGF- β es responsable de que estos cambios sucedan. Diferentes estudios describen la participación de esta vía de señalización en la activación del estroma tumoral (114) y en la progresión (143) en el cáncer de próstata, pero no se conoce el papel de los pericitos.

El objetivo principal de este proyecto es la caracterización de los pericitos en el cancer de próstata y, con ello, su función patológica sobre la angiogénesis. El uso del CancerTool dio paso al análisis de los pericitos basándose en la expresión de desmina. Este marcador en los tumores de PCa de los modelos animales muestra un patrón inespecífico donde se identifica una población de células positivas para desmina alrededor de la zona glandular y otra recubriendo los vasos sanguíneos. La anatomía de la próstata, tanto humana como murina, describe una capa fibromuscular que encapsula las glándulas (15), la cual coincide con la zona positiva para desmina clasificada como área glandular. Por consiguiente, se considera que la desmina localizada en la vasculatura hace referencia a los pericitos (128,144).

Aún con la inesperada promiscuidad del marcador seleccionado, se decidió valorar la expresión total de desmina y la expresión en la cobertura vascular. Considerando todo el tejido, la pérdida de desmina se inicia con la carcinogénesis lo cual concuerda con los cambios anatómicos que sufren las glándulas prostáticas al iniciarse el crecimiento tumoral (23). Por otro lado, la cobertura vascular también disminuye, pero progresivamente siguiendo el comportamiento del tumor. La especificidad de desmina como marcador es dependiente de órgano. En cerebro (76) y retina (145) es específico mientras que también está presente en células cardíacas o musculares (134,146). Aun siendo escasos los estudios en próstata, existe uno que relaciona la pérdida de desmina en los vasos con la presencia tumoral (128).

A raíz de la promiscuidad de desmina, se valoró caracterizar los tumores utilizando los marcadores descartados: *Anpep*, *Cd248*, *Cspg4*, *Pdgfrb* y *Rgs5*. En la práctica, las limitaciones técnicas de las inmunofluorescencias en parafina obligaron a buscar una alternativa. *Acta2* fue seleccionado por ser descrito como marcador de células murales y, en algunos estudios, específico de pericitos (57,128). El comportamiento de α SMA (proteína de *Acta2*) también muestra un patrón de expresión glandular y vascular. La

expresión total se reduce con el inicio de la carcinogénesis. En cambio, al estudiar la cobertura vascular, se demuestra que el tumor y la metástasis no modifican la expresión de α SMA. Estos resultados sugieren que α SMA también es promiscuo, al igual que desmina, pero su expresión no parece específica de pericitos al mantenerse en la cobertura vascular aun con la progresión del tumor. Un estudio de 2020 muestra pericitos positivos para α SMA en la vejiga murina, se relaciona la expresión de dicho marcador con el mayor diámetro de los capilares de la vejiga (134). La expresión de α SMA en los pericitos de la próstata podría deberse a esa misma razón.

Con el objetivo final de testear tratamientos que recuperen las condiciones no patológicas de los pericitos, se diseñaron dos modelos ortotópicos diferentes: con células DU145 y con celulares tumorales de ratones Pb-Cre-PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox}. Los modelos ortotópicos permiten que el tumor crezca en un periodo entre 3 y 7 semanas (147), mientras que los modelos genéticos anteriores necesitaban 6 meses. La expresión de desmina y α SMA disminuye en los dos modelos ortotópicos. Analizando y comparando la expresión de desmina en ambos modelos, se concluye que (i) el modelo PTEN^{flox/flox};LKB1^{flox/flox} es la mejor elección si se valora la brevedad de desarrollo tumoral, ya que se observa pérdida de desmina a las 3 semanas; y (ii) el modelo DU145 es el que presenta menor expresión de desmina en la cobertura de los vasos sanguíneos. Las observaciones en α SMA determinan una pérdida de expresión que no se había visto anteriormente, pero los valores obtenidos son iguales en ambos modelos. Este dato sugiere que α SMA se reduce en condiciones de máxima agresividad. Modelos ortotópicos con LNCaP, células humanas de PCa, describen una pérdida de cobertura vascular caracterizada con α SMA (96)

El objetivo final de todo proyecto es la implementación clínica de los descubrimientos validados previamente en modelos animales. Por este motivo, se está reuniendo una cohorte de biopsias de tumores primarios de pacientes con PCa. Para este proyecto se usaron muestras disponibles de 11 pacientes de las cuales 6 no han sufrido recurrencia tras la cirugía y las otras 5 han recurrido y formado metástasis. La caracterización de desmina muestra menor expresión en los modelos recurrentes. Estos datos reafirman la disminución de expresión contra más agresivo es el tumor, siendo coherente con los resultados obtenidos en todos los modelos animales caracterizados. El comportamiento de α SMA en las biopsias también muestra una pérdida la cual es más similar a los modelos ortotópicos, posiblemente debido a que el grado de progresión del tumor es parecido. Estos resultados determinan que los modelos murinos usados, tanto

genéticamente modificados como ortotópicos, replican condiciones similares las de la enfermedad en humanos.

La caracterización ha mostrado que α SMA podría ser un marcador indicativo de cobertura vascular, mientras que desmina podría estar definiendo un fenotipo más relacionado con los pericitos en condiciones tumorales. Existen hipótesis distintas respecto a si los pericitos desaparecen de la vasculatura en cáncer o, un concepto más reciente, si sufren alteraciones que cambian su identidad (89). Las detalladas imágenes obtenidas por microscopia electrónica permiten localizar e identificar los pericitos en la cobertura vascular (130). Se estudió la presencia de pericitos en la cobertura en modelos metastáticos y controles, no se vieron cambios entre ambos modelos. Estos resultados demuestran que el tumor provoca cambios de en el perfil molecular de los pericitos puesto que siguen estando rodeando en los vasos sanguíneos.

Los cambios moleculares en pericitos no están tan bien descritos como, por ejemplo, la diferenciación de fibroblastos a CAFs (47). Aun así, se sabe que la vía de señalización de TGF- β está descrita como una de las que promueven la progresión tumoral en estadios avanzados mediante la regulación de procesos relacionados con el estroma. Participa en la TEM, en la activación de CAFs y en la angiogénesis, ente otros procesos. Se conoce su implicación en la expresión de genes de vSMC (70) y, aunque son escasos los estudios centrados en pericitos, alguno muestra la influencia de TGF- β en la transición a miofibroblastos en condiciones fibróticas (117).

La isoforma TGF- β 1 se ha visto asociada a expresión de genes de vSMC (70), a la transdiferenciación de pericitos a miofibroblastos en riñones fibróticos (117) y está descrita como biomarcador del cáncer de próstata en muestras murinas y humanas y en ensayos *in vitro* e *in vivo* (109,110), además de a angiogénesis y metástasis (64,111). Por ello, se realizaron ensayos *in vitro* de pericitos a los que se trató con TGF- β 1 para validar los resultados *in silico* que determinaron TGF- β como vía de señalización implicada en la adquisición de un fenotipo patológico en los pericitos. La expresión proteica de los pericitos tratados muestra una activación de la vía mediante la fosforilación de SMAD3 y una pérdida de desmina. Además, el análisis de la activación transcriptómica de marcadores de pericitos y fibroblastos definía un comportamiento heterogéneo. Marcadores de pericitos como desmina y *Anpep* disminuían con el tratamiento, mientras otros fibroblásticos o mesenquimales como *Acta1* y *Acta2* aumentaban.

Una de las limitaciones que tiene el proyecto es el cruce de especies usado en entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los pericitos *in vitro* se obtienen de cerebros ya que es

uno de los órganos más vascularizados y el ratio de pericitos es mayor. Se valoró realizar ensayos *in vitro* con una línea celular de pericitos humanos, pero al caracterizarlos se observó que tenían más fenotipo de fibroblasto que de pericito.

Estudios publicados este último año definen una relación directa entre TGF- β 1 y la modificación molecular de los pericitos. En patologías como la fibrosis pulmonar, se ha descrito una disminución de desmina e incremento de α SMA en pericitos tras ser tratados con TGF- β 1 (148). El glioblastoma secreta TGF- β e inhibe el soporte que los pericitos ejercen sobre los vasos sanguíneos en el cerebro (149). En el riñón está muy bien descrito el proceso de transición pericito-miofibroblasto en condiciones fibróticas. Demuestran la transdiferenciación mediante el tratamiento de TGF- β 1, el cual estimula marcadores profibróticos como α SMA o Vimentina (150), modifica la morfología y reduce niveles de marcadores de pericitos (151). Contradictoriamente a nuestros resultados, en *Chen L et al. 2023* se muestra un incremento de desmina a las 48h de tratamiento con TGF- β 1, el cual definen como característica de miofibroblasto (151).

La implicación de TGF- β en el cambio de perfil molecular de los pericitos, lo vuelve un candidato perfecto para realizar ensayos de inhibición. Al observar la activación de la vía canónica por la fosforilación de pSMAD3 *in vitro*, se decidió usar un inhibidor que evita dicha fosforilación. Los resultados muestran una inactivación de la vía de señalización observada en el marcador control *Cthrc1*. Respecto al resto de marcadores, las tendencias de rescate más claras se detectan en *Acta1* y *Acta2*, seguidas de *Des* y *Myh11*. Estos datos sugieren que la entidad de los pericitos puede estar controlada por la vía canónica de TGF- β y, su inhibición, puede revertir el fenotipo patológico debido al tumor.

La realización de estos ensayos *in vitro* permite reafirmar y validar la importancia de la vía de señalización de TGF- β sobre los pericitos. A su vez, ofrece los datos suficientes para iniciar el ensayo de rescate *in vivo* en modelos murinos. Para este ensayo final, se ha decidido usar el modelo ortotópico con células DU145 ya que es el modelo con menor expresión de desmina en la cobertura basal y el crecimiento tumoral dura únicamente 45 días. Se usará un inhibidor de TGF- β que bloquea sus tres isoformas (TGF- β 1/2/3) y se estudiará la angiogénesis tumoral, la cobertura de los vasos sanguíneos y las funcionalidades vasculares.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis *in silico* utilizando la herramienta CancerTool determina que la expresión de marcadores canónicos de maduración de pericitos disminuye con la agresividad del cáncer de próstata y que dicha pérdida de expresión correlaciona con un peor pronóstico.
2. En la próstata del ratón, desmina es un marcador de células murales perivasculares y de células fibromuculares localizadas en la zona glandular.
3. La expresión de desmina en las células murales que recubren los vasos de la próstata se reduce gradualmente con la progresión del tumor.
4. La identificación por microscopia electrónica de la presencia de pericitos en proximidad de los vasos sanguíneos tumorales sugiere que los pericitos no desaparecen durante la carcinogénesis.
5. Las células murales tumorales en el cáncer de próstata de ratón y humano presentan una firma molecular de activación de la señalización TGF- β .
6. TGF- β induce una pérdida de la contractilidad celular en pericitos *in vitro*.
7. Los pericitos tumorales pierden la expresión de marcadores contráctiles *in vivo* lo que se asocia con el incremento del lumen y un aumento de la extravasación vascular.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Diori Karidio I, Sanlier SH. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. *J Egypt Natl Canc Inst* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Mar 10];33(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34719756/>
2. Kristina SA, Endarti D, Aditama H, American Cancer Society. *Global Cancer - Facts&Figures 4th Edition*. American Cancer Society. 2018;29(1):138–44.
3. Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators - PubMed [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 10]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34761575/>
4. Spandidos DA, Liloglou T, Field JK. Prognostic significance of oncogenes and tumor suppressor genes in human malignancy. *Stem Cells*. 1993;11(3):194–8.
5. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. *Anticancer Res*. 2020 Nov 1;40(11):6009–15.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* [Internet]. 2000 Jan 7 [cited 2023 Mar 15];100(1):57–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10647931/>
7. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Mar 8];12(1):31–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022204/>
8. Welch DR, Hurst DR. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res* [Internet]. 2019 Jun 15 [cited 2023 Mar 8];79(12):3011–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31053634/>
9. Sutherland RM, Rasey JS, Hill RP. Tumor biology. *Am J Clin Oncol* [Internet]. 1988 [cited 2023 Mar 10];11(3):253–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3289360/>
10. Ravi S, Alencar AM, Arakelyan J, Xu W, Stauber R, Wang CCI, et al. An Update to Hallmarks of Cancer. *Cureus* [Internet]. 2022 May 7 [cited 2023 Mar 8];14(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35686268/>
11. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, et al. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Dec 1;7(1).
12. Lin C, Salzillo TC, Bader DA, Wilkenfeld SR, Awad D, Pulliam TL, et al. Prostate Cancer Energetics and Biosynthesis. Vol. 1210, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. 185–237 p.
13. Grozescu T, Popa F CD. Prostate cancer between prognosis and adequate / proper therapy Epidemiologic data Data collected by Cancer Research , UK [2]. *J Med Life*. 2017;10(1):5–12.

14. Sandhu S, Moore CM, Chiong E, Beltran H, Bristow RG, Williams SG. Prostate cancer. *The Lancet* [Internet]. 2021;398(10305):1075–90. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00950-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00950-8)
15. Ittmann M. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Apr 11];8(5). Available from: </pmc/articles/PMC5932577/>
16. Kutikov A, Guzzo TJ, Malkowicz SB. Clinical Approach to the Prostate: An Update. *Radiol Clin North Am*. 2006 Sep;44(5):649–63.
17. Villers A, Steg A, Boccon-Gibod L. Anatomy of the prostate: review of the different models. *Eur Urol* [Internet]. 1991 [cited 2023 Mar 10];20(4):261–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1726083/>
18. Ware JL. Prostate cancer progression: Implications of histopathology. *American Journal of Pathology*. 1994;145(5):983–93.
19. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 1988 [cited 2023 Mar 10];12(8):619–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2456702/>
20. Blacklock NJ. The anatomy of the prostate: relationship with prostatic infection. *Infection* [Internet]. 1991 May [cited 2023 Mar 10];19 Suppl 3(3 Supplement). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2055644/>
21. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA* [Internet]. 2017 Jun 27 [cited 2023 Mar 10];317(24):2532–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28655021/>
22. Brimo F, Montironi R, Egevad L, Erbersdobler A, Lin DW, Nelson JB, et al. Contemporary grading for prostate cancer: implications for patient care. *Eur Urol* [Internet]. 2013 May [cited 2023 Mar 10];63(5):892–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092544>
23. Sathianathen NJ, Konety BR, Crook J, Saad F, Lawrentschuk N. Landmarks in prostate cancer. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Mar 10];15(10):627–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30065357/>
24. La Manna F, Karkampouna S, Zoni E, De Menna M, Hensel J, Thalmann GN, et al. Metastases in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Mar 8];9(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29661810/>
25. Teo MY, Rathkopf DE, Kantoff P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med* [Internet]. 2019 Jan 27 [cited 2023 Mar 10];70:479–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30691365/>
26. Morrissey C, Vessella RL, Lange PH, Lam HM. The biology and clinical implications of prostate cancer dormancy and metastasis. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 Mar 8];94(3):259–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26489605/>

27. Gamat M, McNeel DG. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Mar 10];24(12):T297–310. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28814451/>
28. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* [Internet]. 2001 Jun 2 [cited 2023 Mar 8];357(9270):1777–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11403834/>
29. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Mar 8];35(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31526550/>
30. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* [Internet]. 2002 Dec 26 [cited 2023 Mar 8];420(6917):860–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12490959/>
31. Silva JAF, Calmasini F, Siqueira-Berti A, Moraes-Vieira PMM, Quintar A, Carvalho HF. Prostate immunology: A challenging puzzle. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Mar 8];142. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32853844/>
32. Secker GA, Harvey NL. Regulation of VEGFR Signalling in Lymphatic Vascular Development and Disease: An Update. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jul 2 [cited 2023 Mar 29];22(14). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34299378/>
33. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* [Internet]. 2011 Nov [cited 2023 Mar 8];17(11):1371–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064427/>
34. Karaman S, Detmar M. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J Clin Invest* [Internet]. 2014 Mar 3 [cited 2023 Mar 8];124(3):922–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24590277/>
35. Zeng Y, Opeskin K, Horvath LG, Sutherland RL, Williams ED. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2023 Mar 8];65(3):222–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15948136/>
36. Datta K, Muders M, Zhang H, Tindall DJ. Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. *Future Oncology*. 2010;6(5):823–36.
37. Jobling P, Pundavela J, Oliveira SMR, Roselli S, Walker MM, Hondermarck H. Nerve-Cancer Cell Cross-talk: A Novel Promoter of Tumor Progression. *Cancer Res* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2023 Mar 10];75(9):1777–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25795709/>
38. Zahalka AH, Frenette PS. Nerves in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Mar 10];20(3):143–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31974491/>
39. Silverman DA, Martinez VK, Dougherty PM, Myers JN, Calin GA, Amit M. Cancer-Associated Neurogenesis and Nerve-Cancer Cross-talk. *Cancer Res* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Mar 10];81(6):1431–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33334813/>

40. Wei K, Nguyen HN, Brenner MB. Fibroblast pathology in inflammatory diseases. *J Clin Invest* [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 10];131(20). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34651581/>
41. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* [Internet]. 2007 [cited 2023 Mar 10];257:143–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17280897/>
42. Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2023 Mar 10];128(1):26–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29293096/>
43. Plikus M V., Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell* [Internet]. 2021 Jul 22 [cited 2023 Apr 3];184(15):3852–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34297930/>
44. Davidson S, Coles M, Thomas T, Kollias G, Ludewig B, Turley S, et al. Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Apr 3];21(11):704–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33911232/>
45. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvise M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med* [Internet]. 2017 Mar 6 [cited 2023 Apr 3];214(3):579–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28232471/>
46. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Mar 10];18(12):792–804. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34489603/>
47. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Apr 3];20(3):174–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31980749/>
48. Yu S, Yeh CR, Niu Y, Chang HC, Tsai YC, Moses HL, et al. Altered prostate epithelial development in mice lacking the androgen receptor in stromal fibroblasts. *Prostate* [Internet]. 2012 Mar [cited 2023 Apr 4];72(4):437–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21739465/>
49. Owen JS, Clayton A, Pearson HB. Cancer-Associated Fibroblast Heterogeneity, Activation and Function: Implications for Prostate Cancer. *Biomolecules* [Internet]. 2022 Dec 29 [cited 2023 Mar 8];13(1):67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36671452/>
50. Pederzoli F, Raffo M, Pakula H, Ravera F, Nuzzo PV, Loda M. “Stromal cells in prostate cancer pathobiology: friends or foes?” *Br J Cancer* [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 8]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36482187/>
51. Vitale G, Caraglia M, Jung V, Kamradt J, Gentilini D, Martino MT Di, et al. Molecular Characterization of Cancer Associated Fibroblasts in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*

- [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2023 Apr 4];14(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35740605/>
52. Chen S, Zhu G, Yang Y, Wang F, Xiao YT, Zhang N, et al. Single-cell analysis reveals transcriptomic remodellings in distinct cell types that contribute to human prostate cancer progression. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Mar 8];23(1):87–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33420488/>
 53. da Silva Júnior MM, Matheus WE, Garcia PV, Stopiglia RM, Billis A, Ferreira U, et al. Characterization of reactive stroma in prostate cancer: involvement of growth factors, metalloproteinase matrix, sexual hormones receptors and prostatic stem cells. *Int Braz J Urol* [Internet]. 2015 [cited 2023 Apr 4];41(5):849–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26689510/>
 54. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther* [Internet]. 1994 [cited 2023 Mar 10];63(3):265–311. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7530374/>
 55. Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2011 [cited 2023 Mar 10];27:563–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21756109/>
 56. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* [Internet]. 2008 [cited 2023 Mar 10];73(7):751–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18707583/>
 57. Warren E, Gerecht S. BEYOND THE ENDOTHELIUM: THE ROLE OF MURAL CELLS IN VASCULAR BIOLOGY: In vitro systems to study endothelial/pericyte cell interactions. *Vasc Biol* [Internet]. 2023 Jan 16 [cited 2023 Apr 13];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36645735/>
 58. Cao Y. Antiangiogenic cancer therapy. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2004 [cited 2023 Mar 10];14(2):139–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15018898/>
 59. Viallard C, Larrivé B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Mar 10];20(4):409–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28660302/>
 60. Melegh Z, Oltean S. Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2023 Mar 10];20(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31151317/>
 61. Martin JD, Seano G, Jain RK. Normalizing Function of Tumor Vessels: Progress, Opportunities, and Challenges. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2019 Feb 10 [cited 2023 Apr 15];81:505–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30742782/>
 62. Holm A, Heumann T, Augustin HG. Microvascular Mural Cell Organotypic Heterogeneity and Functional Plasticity. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2023 Apr 15];28(4):302–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307447/>
 63. Figueiredo AM, Villacampa P, Diéguez-Hurtado R, José Lozano J, Kobialka P, Cortazar AR, et al. Phosphoinositide 3-Kinase-Regulated Pericyte Maturation Governs Vascular

- Remodeling. *Circulation* [Internet]. 2020 Aug 18 [cited 2023 Mar 8];142(7):688–704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32466671/>
64. Sarkar C, Goswami S, Basu S, Chakroborty D. Angiogenesis Inhibition in Prostate Cancer: An Update. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Mar 10];12(9):1–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32842503/>
 65. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* [Internet]. 2010 Nov 25 [cited 2023 Apr 15];468(7323):557–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20944627/>
 66. Lendahl U, Nilsson P, Betsholtz C. Emerging links between cerebrovascular and neurodegenerative diseases-a special role for pericytes. *EMBO Rep* [Internet]. 2019 Nov 5 [cited 2023 Apr 15];20(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31617312/>
 67. Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol* [Internet]. 2015 [cited 2023 Mar 10];593(14):3013–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25952975/>
 68. Muhl L, Mocci G, Pietilä R, Liu J, He L, Genové G, et al. A single-cell transcriptomic inventory of murine smooth muscle cells. *Dev Cell*. 2022;57(20):2426–2443.e6.
 69. Liu M, Gomez D. Smooth Muscle Cell Phenotypic Diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(9):1715–23.
 70. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2009 May [cited 2023 Mar 10];29(5):630–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19164813/>
 71. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(3):767–801.
 72. Bkaily G, Abdallah NA, Simon Y, Jazzar A. Vascular smooth muscle remodeling in health and disease Ghassan Bkaily *, Nadia Abou Abdallah, Yanick Simon, Ashley Jazzar, and Danielle Jacques. (819):1–28.
 73. Jiang Z, Zhou J, Li L, Liao S, He J, Zhou S, et al. Pericytes in the tumor microenvironment. *Cancer Lett* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 Mar 10];556. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36682706/>
 74. Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Apr 24];36(2):451–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26661200/>
 75. Picoli CC, Gonçalves BÔP, Santos GSP, Rocha BGS, Costa AC, Resende RR, et al. Pericytes cross-talks within the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* [Internet]. 2021;1876(2):188608. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188608>
 76. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* [Internet]. 2011 Aug 16

- [cited 2023 Apr 15];21(2):193–215. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21839917/>
77. Meijer EM, Van Dijk CGM, Kramann R, Verhaar MC, Cheng C. Implementation of Pericytes in Vascular Regeneration Strategies. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022;28(1):1–21.
 78. Diéguez-Hurtado R, Kato K, Giaimo BD, Nieminen-Kelhä M, Arf H, Ferrante F, et al. Loss of the transcription factor RBPJ induces disease-promoting properties in brain pericytes. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Apr 15];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31249304/>
 79. Teichert M, Milde L, Holm A, Stanicek L, Gengenbacher N, Savant S, et al. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Jul 18 [cited 2023 Apr 15];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28719590/>
 80. Orlich MM, Diéguez-Hurtado R, Muehlfriedel R, Sothilingam V, Wolburg H, Oender CE, et al. Mural Cell SRF Controls Pericyte Migration, Vessel Patterning and Blood Flow. *Circ Res* [Internet]. 2022 Aug 5 [cited 2023 Apr 15];131(4):308–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35862101/>
 81. Eilken HM, Diéguez-Hurtado R, Schmidt I, Nakayama M, Jeong HW, Arf H, et al. Pericytes regulate VEGF-induced endothelial sprouting through VEGFR1. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Apr 15];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29146905/>
 82. Crouch EE, Bhaduri A, Andrews MG, Cebrian-Silla A, Diafos LN, Birrueta JO, et al. Ensembles of endothelial and mural cells promote angiogenesis in prenatal human brain. *Cell* [Internet]. 2022 Sep 29 [cited 2023 Mar 10];185(20):3753–3769.e18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36179668/>
 83. Peyre M, Louvi A, Kalamarides M. Cellular Origin of Sporadic CCMs. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2022 Mar 31 [cited 2023 Apr 15];386(13):1290–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35353973>
 84. Dias DO, Kalkitsas J, Kelahmetoglu Y, Estrada CP, Tatarishvili J, Holl D, et al. Pericyte-derived fibrotic scarring is conserved across diverse central nervous system lesions. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Apr 15];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34535655/>
 85. Kuppe C, Ibrahim MM, Kranz J, Zhang X, Ziegler S, Perales-Patón J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature* [Internet]. 2021 Jan 14 [cited 2023 Apr 15];589(7841):281–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33176333/>
 86. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* [Internet]. 2002 [cited 2023 Apr 15];160(3):985–1000. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11891196/>
 87. Nisancioglu MH, Betsholtz C, Genové G. The absence of pericytes does not increase the sensitivity of tumor vasculature to vascular endothelial growth factor-A blockade.

- Cancer Res [Internet]. 2010 Jun 15 [cited 2023 Apr 15];70(12):5109–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20501841/>
88. Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O’Connell JT, Teng Y, et al. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell* [Internet]. 2012 Jan 17 [cited 2023 Apr 15];21(1):66–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22264789/>
 89. Song S, Ewald AJ, Stallcup W, Werb Z, Bergers G. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2005 Sep [cited 2023 Apr 15];7(9):870–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16113679/>
 90. Hosaka K, Yang Y, Seki T, Fischer C, Dubey O, Fredlund E, et al. Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Sep 20 [cited 2023 Apr 15];113(38):E5618–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27608497/>
 91. Meng YM, Jiang X, Zhao X, Meng Q, Wu S, Chen Y, et al. Hexokinase 2-driven glycolysis in pericytes activates their contractility leading to tumor blood vessel abnormalities. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Apr 15];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34650057/>
 92. McCarty MF, Somcio RJ, Stoeltzing O, Wey J, Fan F, Liu W, et al. Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content. *J Clin Invest* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2023 Apr 26];117(8):2114–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17641778/>
 93. Murgai M, Ju W, Eason M, Kline J, Beury DW, Kaczanowska S, et al. KLF4-dependent perivascular cell plasticity mediates pre-metastatic niche formation and metastasis. *Nat Med* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Apr 26];23(10):1176–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28920957/>
 94. Yonenaga Y, Mori A, Onodera H, Yasuda S, Oe H, Fujimoto A, et al. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* [Internet]. 2005 Sep [cited 2023 Apr 26];69(2):159–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16127287/>
 95. Xian X, Håkansson J, Ståhlberg A, Lindblom P, Betsholtz C, Gerhardt H, et al. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2023 Apr 26];116(3):642–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16470244/>
 96. Welén K, Jennbacken K, Tešan T, Damber JE. Pericyte coverage decreases invasion of tumour cells into blood vessels in prostate cancer xenografts. *Prostate Cancer Prostatic Dis* [Internet]. 2009 [cited 2023 Apr 25];12(1):41–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18521102/>
 97. Wong PP, Muñoz-Félix JM, Hijazi M, Kim H, Robinson SD, De Luxán-Delgado B, et al. Cancer Burden Is Controlled by Mural Cell-β3-Integrin Regulated Crosstalk with Tumor Cells. *Cell* [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2023 Apr 15];181(6):1346–1363.e21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32473126/>

98. Kienast Y, Von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WEF, Goldbrunner R, Herms J, et al. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* [Internet]. 2010 Jan [cited 2023 Apr 26];16(1):116–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20023634/>
99. Dai X, Hua D, Lu X. Roles of TGF- β in cancer hallmarks and emerging onco-therapeutic design. *Expert Rev Mol Med* [Internet]. 2022 Nov 8 [cited 2023 Mar 8];24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36345661/>
100. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell* [Internet]. 2008 Jul 25 [cited 2023 Mar 10];134(2):215–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18662538/>
101. Trelford CB, Dagnino L, Di Guglielmo GM. Transforming growth factor- β in tumour development. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2022 Oct 4 [cited 2023 Mar 10];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36267157/>
102. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2023 Mar 10];8(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27141051/>
103. Rock Moon J, Ju Oh S, Kyun Lee C, Gil Chi S, Jong Kim H. TGF- β 1 protects colon tumor cells from apoptosis through XAF1 suppression. *Int J Oncol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2023 May 6];54(6):2117–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31081052/>
104. Syed V. TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Mar 10];117(6):1279–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26774024/>
105. Ahmadi A, Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Transforming growth factor- β signaling: Tumorigenesis and targeting for cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):12173–87.
106. Roy LO, Poirier MB, Fortin D. Differential Expression and Clinical Significance of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms in GBM Tumors. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Apr 8 [cited 2023 May 6];19(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29642484/>
107. Ding MJ, Su K, Cui GZ, Yang WH, Chen L, Yang M, et al. Association between transforming growth factor- β 1 expression and the clinical features of triple negative breast cancer. *Oncol Lett* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 May 6];11(6):4040–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27313737/>
108. Melisi D, Garcia-Carbonero R, Macarulla T, Pezet D, Deplanque G, Fuchs M, et al. TGF β receptor inhibitor galunisertib is linked to inflammation- and remodeling-related proteins in patients with pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 6];83(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30887178/>
109. Thompson TC, Truong LD, Timme TL, Kadmon D, McCune BK, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem Suppl* [Internet]. 1992 [cited 2023 Mar 10];16H(S16H):54–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1289674/>

110. Steiner MS, Barrack ER. Transforming growth factor-beta 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1992 Jan 1 [cited 2023 Mar 10];6(1):15–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1738367/>
111. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2012 Dec [cited 2023 Mar 8];19(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22930558/>
112. Fournier PGJ, Juárez P, Jiang G, Clines GA, Niewolna M, Kim HS, et al. The TGF- β Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone. *Cancer Cell* [Internet]. 2015 Jun 8 [cited 2023 Apr 12];27(6):809–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25982816/>
113. Li H, Fan X, Houghton JM. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2023 May 6];101(4):805–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17226777/>
114. Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD, Rowley DR. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2023 May 6];65(19):8887–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204060/>
115. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* [Internet]. 2001 Nov 9 [cited 2023 May 6];89(10):930–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11701621/>
116. Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Kotliansky VE, et al. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2002 [cited 2023 May 6];22(6):975–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12067907/>
117. Wu CF, Chiang WC, Lai CF, Chang FC, Chen YT, Chou YH, et al. Transforming growth factor β -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am J Pathol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2023 Mar 10];182(1):118–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23142380/>
118. Jin S, Guerrero-Juarez CF, Zhang L, Chang I, Ramos R, Kuan CH, et al. Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-21246-9>
119. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, et al. Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Softw*. 2019;4(43):1686.
120. Wickham. R package “ggplot2” [Internet]. Vol. 27, Bioinformatics. 2011. 2463–2464 p. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>
121. Aibar S, González-blas CB, Moerman T, Huynh-thu VA, Imrichova H, Hulselmans G, et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts SCENIC : Single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat Methods*. 2018;14(11):1083–6.

122. Korsunsky I, Millard N, Fan J, Slowikowski K, Zhang F, Wei K, et al. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat Methods* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Apr 17];16(12):1289–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31740819/>
123. Map A, Gene E, Accession G, Description N, Gene E, This D, et al. *org.Mm.eg.db*. 2012;(xx).
124. R FRA lowapi RBRG. Package ‘AnnotationDbi.’ 2023;
125. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation* [Internet]. 2021 Aug 28 [cited 2023 Mar 27];2(3). Available from: <http://www.cell.com/article/S2666675821000667/fulltext>
126. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012;16(5):284–7.
127. Oliveira DSM, Dzinic S, Bonfil AI, Saliganan AD, Sheng S, Bonfil RD. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. *Bosn J Basic Med Sci* [Internet]. 2016 [cited 2023 Mar 10];16(1):8–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26773172/>
128. Clément-Colmou K, Potiron V, Pietri M, Guillonneau M, Jouglar E, Chiavassa S, et al. Influence of Radiotherapy Fractionation Schedule on the Tumor Vascular Microenvironment in Prostate and Lung Cancer Models. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 May 9];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31906502/>
129. Killingsworth MC, Wu X. Vascular pericyte density and angiogenesis associated with adenocarcinoma of the prostate. *Pathobiology*. 2011;78(1):24–34.
130. Wieser E, Strohmeyer D, Rogatsch H, Horninger W, Bartsch G, Debbage P. Access of tumor-derived macromolecules and cells to the blood: An electron microscopical study of structural barriers in microvessel clusters in highly malignant primary prostate carcinomas. *Prostate*. 2005;62(2):123–32.
131. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(3):174–86.
132. Chavkin NW, Hirschi KK. Single Cell Analysis in Vascular Biology. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7(March):1–14.
133. Salcher S, Sturm G, Horvath L, Untergasser G, Kuempers C, Fotakis G, et al. High-resolution single-cell atlas reveals diversity and plasticity of tissue-resident neutrophils in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2022 Dec 12 [cited 2023 May 17];40(12):1503-1520.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36368318/>
134. Muhl L, Genové G, Leptidis S, Liu J, He L, Mocci G, et al. Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17740-1>

135. Kalucka J, de Rooij LPMH, Goveia J, Rohlenova K, Dumas SJ, Meta E, et al. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell*. 2020;180(4):764-779.e20.
136. Baek SH, Maiorino E, Kim H, Glass K, Raby BA, Yuan K. Single Cell Transcriptomic Analysis Reveals Organ Specific Pericyte Markers and Identities. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9(June):1–13.
137. Luo H, Xia X, Huang L Bin, An H, Cao M, Kim GD, et al. Pan-cancer single-cell analysis reveals the heterogeneity and plasticity of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Nat Commun*. 2022;13(1).
138. Schaum N, Karkanias J, Neff NF, May AP, Quake SR, Wyss-Coray T, et al. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature* [Internet]. 2018 Oct 18 [cited 2023 May 17];562(7727):367–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30283141/>
139. Ma X, Guo J, Liu K, Chen L, Liu D, Dong S, et al. Identification of a distinct luminal subgroup diagnosing and stratifying early stage prostate cancer by tissue-based single-cell RNA sequencing. *Mol Cancer* [Internet]. 2020 Oct 8 [cited 2023 May 17];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33032611/>
140. Song H, Weinstein HNW, Allegakoen P, Wadsworth MH, Xie J, Yang H, et al. Single-cell analysis of human primary prostate cancer reveals the heterogeneity of tumor-associated epithelial cell states. *Nat Commun* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 May 17];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35013146/>
141. Joseph DB, Henry GH, Malewska A, Reese JC, Mauck RJ, Gahan JC, et al. Single-cell analysis of mouse and human prostate reveals novel fibroblasts with specialized distribution and microenvironment interactions. *Journal of Pathology*. 2021;255(2):141–54.
142. Dessalles CA, Babataheri A, Barakat AI. Pericyte mechanics and mechanobiology. *J Cell Sci* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Mar 10];134(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33753399/>
143. Wu T, Wang W, Shi G, Hao M, Wang Y, Yao M, et al. Targeting HIC1/TGF- β axis-shaped prostate cancer microenvironment restrains its progression. *Cell Death Dis* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Mar 8];13(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35853880/>
144. Heidegger I, Kern J, Ofer P, Klocker H, Massoner P. Oncogenic functions of IGF1R and INSR in prostate cancer include enhanced tumor growth, cell migration and angiogenesis. *Oncotarget* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 9];5(9):2723–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24809298/>
145. Orlich MM, Diéguez-Hurtado R, Muehlfriedel R, Sothilingam V, Wolburg H, Oender CE, et al. Mural Cell SRF Controls Pericyte Migration, Vessel Patterning and Blood Flow. *Circ Res* [Internet]. 2022 Aug 5 [cited 2023 Apr 15];131(4):308–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35862101/>
146. Agnetti G, Herrmann H, Cohen S. New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis. *FEBS J* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 May 20];289(10):2755–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33825342/>

147. Pavese J, Ogden IM, Bergan RC. An Orthotopic Murine Model of Human Prostate Cancer Metastasis. *J Vis Exp* [Internet]. 2013 [cited 2023 May 21];(79):50873. Available from: [/pmc/articles/PMC3814297/](https://pmc/articles/PMC3814297/)
148. Wang Y, Chen D, Xie H, Zhou S, Jia M, He X, et al. LncRNA GAS5 suppresses TGF- β 1-induced transformation of pulmonary pericytes into myofibroblasts by recruiting KDM5B and promoting H3K4me2/3 demethylation of the PDGFR α / β promoter. *Mol Med* [Internet]. 2023 Mar 14 [cited 2023 May 16];29(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36918759/>
149. Schumacher L, Slimani R, Zismare L, Ehlers J, Kleine Borgmann F, Fitzgerald JC, et al. TGF-Beta Modulates the Integrity of the Blood Brain Barrier In Vitro, and Is Associated with Metabolic Alterations in Pericytes. *Biomedicines* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2023 May 16];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672722/>
150. Lim JH, Yook JM, Oh SH, Jeon SJ, Noh HW, Jung HY, et al. Paricalcitol Improves Hypoxia-Induced and TGF- β 1-Induced Injury in Kidney Pericytes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2023 May 16];22(18). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34575914/>
151. Chen L, Li X, Deng Y, Chen J, Huang M, Zhu F, et al. The PI3K-Akt-mTOR pathway mediates renal pericyte-myofibroblast transition by enhancing glycolysis through HKII. *J Transl Med* [Internet]. 2023 May 13 [cited 2023 May 16];21(1):323. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37179292/>