

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI**  
**COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



**“Resistina como inductora de migración e invasión en células tumorales prostáticas PC3: Rol de vesículas extracelulares”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA**

P R E S E N T A

**M.C. MARIO ISRAEL OREGEL CORTEZ**

T U T O R

**DR. OCTAVIO GALINDO HERNANDEZ**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA DE DICTAMEN DE LA EVALUACIÓN DE LA FASE ESCRITA DEL  
TRABAJO TERMINAL**

*Mexicali, B.C., a 19 de Enero de 2024.*

Los abajo formantes, miembros del Jurado Dictaminador del trabajo terminal titulado **“Resistina como inductora de migración e invasión en células tumorales prostáticas PC3: Rol de vesículas extracelulares”**, que, para obtener el Grado de **Doctorado**, presenta el C. Mario Israel Oregel Cortez, una vez concluida la evaluación correspondiente, hemos resuelto aprobarla.

Dr. Octavio Galindo Hernández  
Presidente

Dr. Victor Guadalupe García González  
Secretario

Dr. Eloy Andrés Pérez Yépez  
Sinodal

Dr. Nicolás Addiel Serafín Higerá  
Sinodal

Dr. Raúl Díaz Molina  
Sinodal

# Universidad Autónoma de Baja California

## Facultad de Medicina

**“Resistina como inductora de migración e invasión en células tumorales prostáticas PC3: Rol de vesículas extracelulares”**

### **Autor de la tesis**

**MCS. Mario Israel Oregel Cortez**

Universidad Autónoma de Baja California  
Mexicali, Baja California

### **Tutor y Director de Tesis**

**Dr. Octavio Galindo Hernández**

Facultad de Medicina Mexicali  
Universidad Autónoma de Baja California  
Mexicali, Baja California

### **Sinodal**

**Dr. Eloy Perez Yopez**

Investigador en Ciencias Médicas Nivel D.  
Unidad de Investigación. Instituto Nacional de Cancerología  
CDMX-México

### **Sinodal**

**Dr. Nicolás Addiel Serafin Higuera**

Unidad Ciencias de la Salud, Facultad de Odontología Mexicali  
Universidad Autónoma de Baja California  
Mexicali, Baja California

### **Sinodal**

**Dr. Raúl Díaz Molina**

Facultad de Medicina Mexicali  
Universidad Autónoma de Baja California  
Mexicali, Baja California

### **Sinodal**

**Dr. Victor Guadalupe García González**

Coordinador de Posgrado e Investigación  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Baja California  
Mexicali, Baja California

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por convertirse en mi segunda casa durante estos años, apoyando mi crecimiento profesional y personal de una forma plena y completa.

A la Facultad de Medicina Mexicali de la UABC, por la disposición en apoyar mi trabajo de investigación, brindando sus instalaciones y recursos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por creer en mi proyecto de investigación y brindar el apoyo durante este proceso.

Al Dr. Octavio Galindo Hernández, por creer en mí desde un principio, jamás me dejaste solo, me apoyaste, impulsaste y creaste en mi interior la necesidad de crear conocimiento, gracias por darme a conocer este camino, lo que soy es gracias a ti.

A mis sinodales Dr. Eloy Perez Yopez, Dr. Victor Guadalupe García González, Dr. Nicolás Addiel Serafin Higuera y Dr. Raúl Díaz Molina, por su guía incomparable, me mostraron el camino durante este proceso, siempre brindándome su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio, M.C.S. Georgina Quintana González, Lic. Jesus Medina, MD. Qiling Tan, MD. Merino Rubio Hector Alejandro, Dr. Angel Armando Pulido Capiz y Dr. Héctor Frayde Gómez, a todos gracias por su apoyo, aprendí que el trabajo duro y las risas pueden ir de la mano, gracias por estar presentes en los malos y buenos momentos, al final del día, somos una segunda familia.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, gracias por nunca dejarme desamparado.

A mi esposa Marisela Rodríguez García, te agradezco estar a mi lado en todo tiempo, los logros se alcanzan en quipo, gracias por el apoyo siempre brindado, te amo.

A mi hijo Bernardo Salvador Oregel Rodríguez, las palabras jamás serán suficientes para expresar lo que siento por ti, todo es por ti y para ti, te amo.

A mi madre Lilia Edith Cortez, gracias por siempre estar a mi lado, por mostrarme que siempre puedo dar lo mejor de mí, todo lo que tengo es por ti, te amo madre.

A mi tío Jesus Hernández Cortez †, a pesar de todo y sin importar lo que suceda, la familia siempre se protege.

A mi padre Salvador Mancilla †, te agradezco todo lo que hiciste por mi, nunca dudaste en darme tu apoyo, fuiste un pilar en la construcción de mi vida, te extraño.

## Abreviaturas

3D	Tres dimensiones
Acs	Anticuerpos
Akt	Proteína cinasa B
Ala	Alanina
AMPK	Proteína cinasa de adenosina monofosfato
Anx	Anexina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspártico
CAP1	Ciclasa asociada a citoesqueleto de actina reguladora de proteína 1
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Ctrl	Control
Cys	Cisteína
D.E.	Desviación estándar
DMEM	Medio eagle modificado dulbecco's
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECL	Electroquimioluminiscencia
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK	Quinasa reguladora de señal extracelular
ERM	Proteínas Ezrin, Radixin y Miosin
FAK	Cinasa de adhesión focal

Flot	Flotilina
FLVEs	Fracción libre de vesículas extracelulares
g	Gramo
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
His	Histidina
HSP	Proteína de choque termico
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de masa corporal
JAK	Cinasa Janus
kDa	Kilo Dalton
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacárido
Lys	Lisina
MC	Medio condicionado
min	Minuto
miRNA	Micro ácido ribonucleico
mL	Mililitros
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinasa
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

ncRNA	Ácido ribonucleico no codificante
MVs	Multivesicular
ng	Nanogramos
NIP	Neoplasia intraepitelial prostática
nm	Nanómetro
Phe	Fenilalanina
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
Pro	Prolina
ROR1	Receptor huérfano de tirosina cinasa
RTK	Receptor tirosina cinasa
Ser	Serina
SFB	Suero Fetal Bovino
SOCS3	Supresor de señal de citosina 3
STAT	Señal traductora y activador de transcripción
Thr	Treonina
TLR4	Receptor tipo toll 4
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Trp	Triptófano
Val	Valina
VEs	Vesículas extracelulares
WASP	Proteína de síndrome Wiskott-Aldrich
WB	Western Blot

$\mu\text{L}$

Microlitro

$\mu\text{M}$

Micro molar

$\mu\text{m}$

Micrómetro

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre resistina y el receptor CAP1. ....	43
Tabla 2. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 1 entre CAP1 y Resistina. ....	44
Tabla 3. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 2 entre CAP1 y Resistina. ....	46
Tabla 4. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 3 entre CAP1 y Resistina. ....	48
Tabla 5. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la resistina y el receptor TLR4. ....	51
Tabla 6. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 1 entre TLR4 y Resistina. ....	52
Tabla 7. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 2 entre TLR4 y Resistina. ....	54
Tabla 8. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 3 entre TLR4 y Resistina. ....	56

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Modelo representativo de la progresión tumoral prostática. -----	19
Figura 2 Cascada de Señalización modelada por FAK en la progresión tumoral. -	22
Figura 3. Biogénesis de las vesículas extracelulares. -----	27
Figura 4. Captación autocrina y paracrina de moléculas cargo mediante vesículas extracelulares.-----	29
Figura 5. Diagrama del diseño metodológico general del proyecto. -----	34
Figura 6. Diagrama del diseño metodológico general del proceso de ultracentrifugación diferencial. -----	40
Figura 7. Docking molecular 1 del receptor CAP1 (bronce) y resistina (blanco). --	43
Figura 8. Docking molecular 2 del receptor CAP1 (bronce) y resistina (blanco). --	46
Figura 9. Docking molecular 2 del receptor CAP1 (bronce) y resistina (blanco). --	48
Figura 10. Docking molecular 1 del receptor TLR4 (Azul) y resistina (blanco). ----	52
Figura 11. Docking molecular 2 del receptor TLR4 (Azul) y resistina (blanco). ----	54
Figura 12. Docking molecular 3 del receptor TLR4 (Azul) y resistina (blanco). ----	56
Figura 13. La resistina induce la migración en células de cáncer de próstata. ----	59
Figura 14. La resistina induce el incremento en los niveles de fosforilación de la cinasa FAK en células de cáncer de próstata. -----	61
Figura 15. La resistina aumenta la secreción de MMP -2 y MMP -9 en células PC3. -----	63
Figura 16. La resistina promueve un incremento en los esferoides de células PC3. -----	65
Figura 17. Estandarización de la técnica Ultra-centrifugación diferencial.-----	66
Figura 18. Expresión de flotilina 2 y CD63 en muestra ultra-centrifugada. -----	67
Figura 19. Las vesículas extracelulares derivadas de células PC3 tratadas con resistina inducen la migración celular en células PC3. -----	69
Figura 20. Las vesículas extracelulares derivadas de células PC3 tratadas con resistina inducen la invasión celular en PC3 de forma autocrina. -----	71
Figura 21. Vesículas extracelulares derivadas de células PC3 tratadas con resistina inducen la invasión celular en PC3 de forma autocrina. -----	73
Figura 22. Las VEs regulan la migración en células PC3 dependiente de la	

concentración.-----75

Figura 23. Las VEs presentan moléculas cargo asociadas a la progresión tumoral en células PC3 estimuladas en presencia o ausencia de resistina.-----76

# CONTENIDO

I. Marco teórico.	18
I.1. Generalidades del cáncer de próstata	18
I.2. Cáncer prostático y obesidad	20
I.3. Migración e invasión celular	21
I.4 Adipocinas	23
III. Antecedentes	24
III.1 Resistina y su asociación con cáncer	24
III.2. Receptores tipo Toll y su interacción con resistina	25
III.3 Vesículas extracelulares y su papel en cáncer	27
IV. Justificación	30
V. Hipótesis	31
VI. Objetivo general	32
VI.1. Objetivos particulares.	32
VII. Metodología	34
VIII. Material biológico y métodos	35
VIII.1. Línea Celular	35
VIII.2. Anticuerpos	35
VIII.3. Cultivos celulares	36
VIII.4. Docking molecular	36
VIII.5. Ensayo de cierre de herida	36
VII.6. Ensayo de invasión en cámara de Boyden	37
VIII.7. Inmunodetección	38
VIII.8. Zimografía	38

VIII.9. Ensayo de crecimiento de esferoides (cultivo 3D). -----	39
VIII.10. Aislamiento y caracterización de VEs -----	39
VIII.11. Análisis estadístico -----	40
IX. Aspectos éticos, normativos y de seguridad-----	41
X. Resultados-----	42
X.1 Docking molecular sobre la interacción de CAP1 o TLR4 con Resistina. -----	42
X.1.1 Docking molecular Resistina vs CAP1. -----	42
Tabla 1. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre resistina y el receptor CAP1. -----	43
Tabla 2. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 1 entre CAP1 y Resistina. -----	44
Tabla 3. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 2 entre CAP1 y Resistina. -----	46
Tabla 4. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 3 entre CAP1 y Resistina-----	48
X.1.2 Docking molecular Resistina vs TLR4.-----	51
Tabla 5. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la resistina y el receptor TLR4.-----	51
Tabla 6. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 1 entre TLR4 y Resistina. -----	52
Tabla 7. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 2 entre TLR4 y Resistina. -----	54
Tabla 8. Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 3 entre TLR4 y Resistina. -----	56
X.2. Resistina promueve el incremento en la migración de células de la línea celular prostática PC3.-----	58

X.3. La resistina incrementa los niveles de fosforilación de la cinasa de adhesión focal FAK en la línea celular prostática PC3. -----	60
X.4. La resistina promueve un incremento de los niveles de secreción de la MMP -2 y MMP -9 en la línea celular tumoral prostática PC3. -----	62
X.5. La resistina induce un aumento en el crecimiento de esferoides de cultivo 3D en células tumorales PC3. -----	64
X.6. Estandarización de la técnica de ultracentrifugación diferencial. -----	66
X.7. Resistina induce la secreción de VEs que promueven la migración celular en células prostáticas PC3. -----	68
X.8. Las VEs de cultivos PC3 tratados en presencia de resistina incrementan los niveles de secreción de la MMP -2 y MMP -9. -----	70
X.9. VEs derivadas del tratamiento con resistina inducen invasión en células PC3.	
72	
X.10. Efecto de las VEs provenientes de estímulos de resistina en células PC3. -	74
X.11. Las VEs transportan moléculas cargo involucradas en la progresión tumoral.	
76	
XI. Discusión-----	77
XII. Conclusiones-----	82
XIII. Bibliografía -----	84
XIV. Anexos-----	95

## **I. Resumen**

La resistina es una adipocina con funciones metabólicas e inflamatorias. Los estudios epidemiológicos y traslacionales informan que un aumento en los niveles plasmáticos y la expresión tisular de resistina aumenta la agresividad de las células tumorales prostáticas. Las vesículas extracelulares (VEs) se secretan de forma constitutiva e inducidas por citocinas, factores de crecimiento y calcio, además de encontrarse en múltiples fluidos biológicos como la saliva, el suero, el semen y la orina. En particular, se ha demostrado que las VEs promueven la progresión tumoral mediante la inducción de proliferación, crecimiento, angiogénesis, resistencia a la quimioterapia y metástasis. Sin embargo, aún queda por estudiar el papel de la resistina en la migración, invasión y secreción de VEs en células tumorales prostáticas invasivas. En el presente estudio, demostramos que la resistina induce una mayor migración e invasión en las células PC3. Además, estos fenómenos van acompañados de niveles elevados de p-FAK y una mayor secreción de MMP-2 y MMP-9 en células PC3 tratadas con resistina. De manera interesante, las VEs aisladas de sobrenadantes de células PC3 tratadas con resistina, inducen un aumento en la migración e invasión acompañado en conjunto de un incremento de las MMP-2 y MMP-9 en un modelo de estimulación autocrina. En resumen, nuestros datos demuestran por primera vez que la resistina induce la migración e invasión, en parte a través de la secreción de VEs con características pro-invasivas en las células PC3.

**Abstract.**

Resistin is an adipokine with metabolic and inflammatory functions. Epidemiological and translational studies report that an increase in plasma levels and tissue expression of resistin increases the aggressiveness of prostate tumor cells. Extracellular vesicles (EVs) are secreted constitutively and induced by cytokines, growth factors, and calcium and are found in multiple biological fluids such as saliva, serum, semen, and urine. EVs have been shown to promote tumor progression through the induction of proliferation, growth, angiogenesis, resistance to chemotherapy, and metastasis. However, the role of resistin in the migration, invasion, and secretion of EVs in invasive prostate tumor cells remains to be studied. In the present study, we demonstrate that resistin induces increased migration and invasion in PC3 cells. In addition, these phenomena are accompanied by increased p-FAK levels and increased secretion of MMP-2 and MMP-9 in resistin-treated PC3 cells. Interestingly, EVs isolated from supernatants of PC3 cells treated with resistin induce an increase in migration and invasion accompanied by high MMP-2 and MMP-9 secretion in an autocrine stimulation model. In summary, our data for the first time demonstrate that resistin induces migration and invasion, partly through the secretion of EVs with pro-invasive characteristics in PC3 cells.

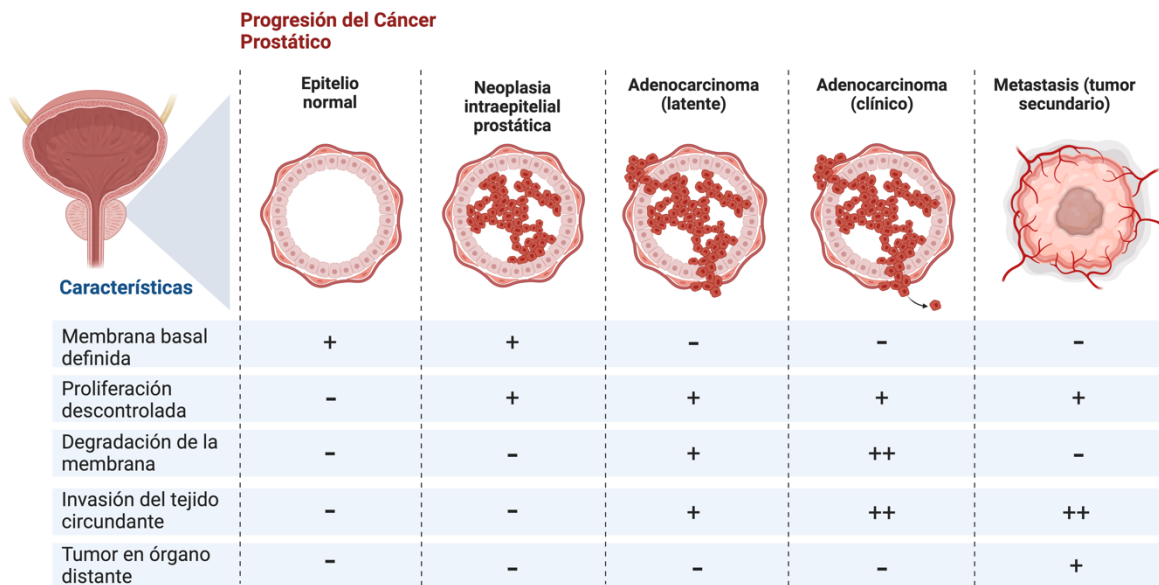
## **II. Marco teórico.**

### **II.1. Generalidades del cáncer de próstata**

La próstata es una glándula constituyente del sistema genitourinario situada debajo de la vejiga y por delante del recto. Es constituida por múltiples estructuras, la mayoría del tejido glandular en la próstata se encuentra presente en la zona periférica y el líquido seminal producido por estas glándulas desemboca aproximadamente de entre 12-20 ductos excretores, para posteriormente proceder a ser secretado en la uretra [1]. Histológicamente, la glándula prostática consiste en epitelio pseudoestratificado con tres tipos principales de células epiteliales diferenciadas: células epiteliales luminales (son las más cercanas al lumen que corresponden al 90% de las células prostáticas), células epiteliales basales (dan origen a las células luminales y conforman el 10% de las células prostáticas) y células neuroendocrinas (son menos del 1% de las células prostáticas y son capaces de producir serotonina) [1,2].

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna no cutánea más común en hombres en el mundo occidental [3]. En el año 2020, la base de datos GLOBOCAN reportó más de 1.4 millones de nuevos diagnósticos y más de 350,000 muertes alrededor del mundo, además de estimar que para el año 2040 el número de incidencia incrementará cerca de 2.5 millones de nuevos diagnósticos y estima un crecimiento de más del 50% en muertes por cáncer prostático [4], colocando al cáncer prostático en la quinta causa de muerte en hombres en todo el planeta [1]. El cáncer de próstata inicia por un crecimiento tumoral maligno en la glándula prostática, el cual se manifiesta por una proliferación descontrolada de las células epiteliales luminales secretoras, secundaria a mutaciones en los genes supresores de tumores y proto-oncogenes (p53, Ras, Src, FAK y PI3K) [5-7]. Estas mutaciones pueden ser adquiridas durante la vida del individuo y catalogarse como una enfermedad esporádica, o bien ser heredadas, describiéndose como una enfermedad familiar [1,8]. Si bien el cáncer de próstata puede originarse a partir de cualquier tipo celular

presente en la glándula prostática e ir progresando como se muestra en la figura 1, alrededor del 95% de los tumores prostáticos son adenocarcinomas que se originan de las células epiteliales luminales [8,9]. Sin embargo, en algunos casos el cáncer puede propagarse a tejidos y órganos distantes como al esqueleto, ganglios, pulmones dando origen a tumores secundarios o también conocidos como metastásicos [6,10-12].



**Figura 1. Modelo representativo de la progresión tumoral prostática.**

Representación esquemática de un epitelio normal, neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma latente, adenocarcinoma clínico y metastásico. En un epitelio normal se encuentran a las células rodeadas de una membrana basal. Una neoplasia prostática intraepitelial presenta una proliferación descontrolada de las células, generando una disminución numérica de células mioepiteliales, un adenocarcinoma latente presenta una degradación parcial de la membrana basal. Posteriormente cuando las células invaden el tejido circundante el tumor es clasificado como adenocarcinoma clínico. Un tumor metastásico prostático es aquel desarrollado en un órgano distante del tumor primario (Figura adaptada de Michael M. Shen and Cory Abate-Shen. Genes Dev. 2010).

## **II.2. Cáncer prostático y obesidad**

En la actualidad existen diversos estudios epidemiológicos que sustentan la relación entre la obesidad y el desarrollo de diferentes tipos de cáncer [13-16]. El tejido adiposo es un órgano endócrino que secreta múltiples moléculas bioactivas que regulan el metabolismo y el sistema inmunológico [13,17-19]. La hipertrofia de los adipocitos conjuntamente con un exceso de tejido adiposo presente en la obesidad conlleva a alteración del metabolismo de los tejidos periféricos. Por ello, la obesidad se encuentra asociada altamente a diversas comorbilidades como lo son la hipertensión, dislipidemia, resistencia a insulina, diabetes y un incremento en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [13,19-22]. Así mismo, numerosos estudios epidemiológicos confirman la asociación entre la obesidad y diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon, de mama, de páncreas, de ovario y de próstata [13,14,23-25]. Se ha estimado que al menos 20% de todos los tumores son causados por un exceso de peso, además de que personas con obesidad (IMC  $\geq$  30) presentan un riesgo mayor de desarrollar cáncer con respecto a aquellos que presentan un IMC normal (18-25) [26,27]. Particularmente, el cáncer prostático presente en hombres obesos es más agresivo con respecto a aquellos individuos con una talla normal, por lo que la obesidad incrementa la mortalidad en estos pacientes [13,26], mientras que una reducción en el peso corporal se asocia a una disminución del riesgo de desarrollar cáncer de próstata [26]. Así mismo, diversos estudios experimentales han demostrado que una dieta rica en grasas puede inducir un microambiente inflamatorio en el tejido prostático y promover la iniciación y progresión de cáncer de próstata en roedores [27-29].

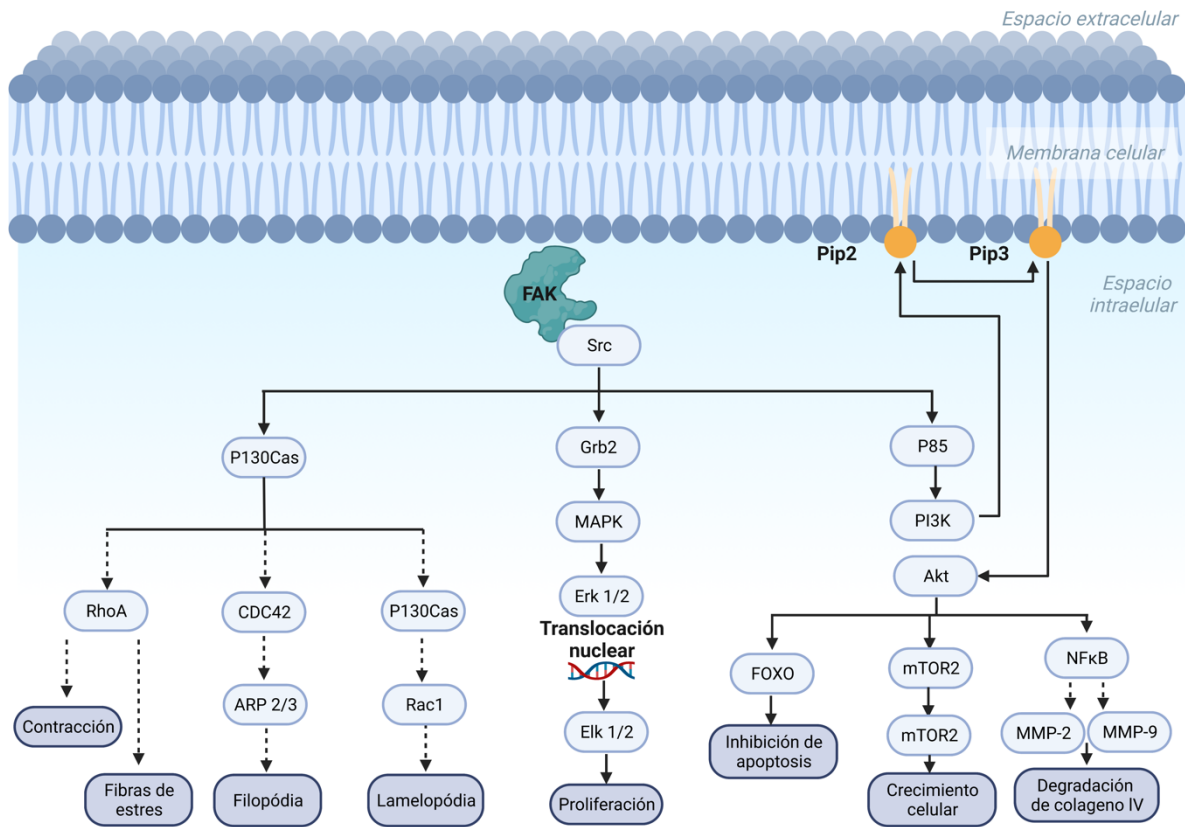
El tejido adiposo libera más de 20 diferentes tipos de adipocinas que actúan de manera autocrina, paracrina o endocrina y bajo condiciones normales, regulan diversos procesos fisiológicos como la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de lípidos, la sensibilidad a la insulina, la presión sanguínea, angiogénesis y procesos inflamatorios [13,14,26]. En cambio, en la obesidad la comunicación paracrina entre adipocitos y células del sistema inmune se altera debido, entre otros factores, a que se desregula la secreción de adipocinas y esto conlleva a una

inflamación crónica de bajo grado. El aumento o disminución en la secreción de hormonas, factores de crecimiento y adipocinas derivadas del tejido adiposo promueven el crecimiento, proliferación, migración e invasión tumoral con subsecuente metástasis. En el caso particular del cáncer de próstata las adipocinas leptina, visfatina y resistina se han relacionado como promotores de diversas etapas de progresión tumoral, aunque los mecanismos moleculares involucrados no han sido completamente elucidados [26-31]

### **II.3. Migración e invasión celular**

La migración y la invasión están implicadas en la fisiopatología del cáncer, incluyendo la metástasis, siendo una característica primordial de los tumores malignos, así como la principal causa de muerte por cáncer [32]. La metástasis involucra la migración celular a través de los tejidos, la cual es la resultante de un ciclo continuo de pasos interdependientes y coordinados que involucran la maquinaria del citoesqueleto. La migración celular comprende la formación de protrusiones, las cuales son formadas por la polimerización de actina, así como la participación de diversas proteínas, tales como Arp2/3, WASP, WAVE y Cdc42 [32,33].

La integrina  $\alpha\beta3$  es un receptor transmembrana heterodimérico que une proteínas de la matriz extracelular que promueven la sobrevivencia, proliferación y migración de las células tumorales prostáticas [34]. La integrina  $\alpha\beta3$  regula la activación de diversas proteínas, entre las que se encuentra la cinasa de adhesión focal (FAK). Posterior a la formación de complejos entre integrinas, FAK puede ser reclutada a los sitios de agrupación de integrinas y activada a través de mecanismos no definidos que involucran la formación de complejos de FAK y su autofosforilación en Y397. La proteína FAK activa promueve el crecimiento y metástasis de las células cancerosas prostáticas a través de la estimulación de sus efectores río abajo, como Src, PI3K/Akt y ERK, proteínas mediadoras de proliferación, sobrevivencia, migración, invasión y metástasis [34,35].



**Figura 2 Cascada de Señalización modelada por FAK en la progresión tumoral.**

La quinasa de adhesión focal (FAK) puede ser activada por agrupamientos de integrinas, receptores de citocinas, receptores tirosina quinasa (RTK) y receptores acoplados a proteína G (GPCR). Es capaz de modular vías de señalización río abajo asociados a múltiples procesos biológicos los cuales se ven implicados en la progresión tumoral, como la remodelación del citoesqueleto celular mediada por las fibras de estrés, lamelopodia, filopodia y contracción celular, proliferación, inhibición de la apoptosis, el crecimiento celular y la degradación de colágeno (Figura adaptada de Hsiang-Hao Chuang. Molecular Sciences. 2022).

## II.4 Adipocinas

Las adipocinas son ampliamente secretadas por el tejido adiposo. A la fecha, se han logrado detectar una gran variedad de dichas moléculas, sin embargo, los procesos y funciones que pueden llegar a presentar no han sido elucidados en su totalidad [36]. Ahora bien, por su asociación al tejido adiposo es que se vinculan a procesos inflamatorios y a la obesidad [37,38].

Dentro las adipocinas más estudiadas en este campo encontramos a la leptina, tiene un peso molecular de 16 kDa y es altamente producida por el tejido adiposo [39]. Estructurada por cuatro hélices  $\alpha$  y estabilizada por enlaces disulfuro muy similar a la IL-6 [40]. La literatura menciona que la leptina interactúa a nivel cerebral activando vías de señalización asociadas al gasto energético y a controlar el apetito [41]. Además, de tener un papel regulatorio mediado por la MMP -2 [42]. Por otro lado, la adiponectina cuenta con un peso de 30 kDa y fue descubierta en los años 90 como una proteína secretada por el tejido adiposo [43]. Se conocen tres tipos de receptores de adiponectina, los cuales son AdipoR1, AdipoR2 y T-cadherina [44,45], no obstante, el receptor T-cadherina a pesar de activarse mediante la adiponectina, no presenta señalización río abajo [45]. De manera interesante, la adiponectina se encuentra en un nivel opulento en circulación, sin embargo, dichos niveles los encontramos inversamente correlacionados con el índice de masa corporal (IMC), el nivel de triglicéridos o con el proceso de resistencia a la insulina [46,47]. En conjunto de dicha información, inicialmente se propuso que en ratones puede favorecer la activación de AMPK mediante el estímulo de la utilización de glucosa, dicho fenómeno se asocia a la disminución de la resistencia a la insulina mediante la oxidación de los ácidos grasos, por otro lado, en humanos se ha observado como la resistina presenta un papel mediador de la resistencia a la insulina a través de AMPK [8,49,144]. La IL-6 es producida por diferentes tipos de células, como los fibroblastos, macrófagos, músculo esquelético, células endoteliales y adipocitos [50]. Se encuentra conformada por cuatro hélices  $\alpha$  e interactúa con el receptor de IL-6 que luego se asocia con la glucoproteína gp130 para desencadenar la cascada de señalización [51,52]. La literatura menciona que un tercio de la IL-6 circulante es

derivada del tejido adiposo, además de que sus niveles se encuentran correlacionados con la circunferencia de cintura y con el IMC en diversos datos clínicos [53,54]. TNF- $\alpha$  es una de las primeras citocinas descubiertas y producidas por el tejido adiposo que fueron descubiertas [55], tiene un peso de 26 kDa y es sintetizado como un monómero transmembranal, además, puede ser solubilizado por la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  convirtiéndolo en una proteína de 17 kDa.

## **IV. Antecedentes**

### **IV.1 Resistina y su asociación con cáncer**

Resistina fue encontrada por vez primera en ratones obesos, derivada de células que se encuentran en el tejido adiposo y asociada en el proceso de resistencia a la insulina mediada por sobrepeso [56-59]. La resistina (también conocida como factor secretor específico del tejido adiposo) es una proteína rica en residuos de cisteína originalmente propuesta como vínculo entre la obesidad y diabetes. En humanos, esta adipocina se encuentra en circulación sanguínea (5 a 55 ng/mL) como un oligómero de 660 kDa [60], siendo ampliamente expresada y secretada por monocitos y macrófagos residentes en el tejido adiposo visceral, mientras que los adipocitos y preadipocitos expresan niveles mínimos de dicha proteína [13,26,61,62].

Estructuralmente, resistina presenta una composición inusual de varias subunidades que se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes [63]. Por un lado, los receptores de Decorina y ROR1 son propios de la resistina en modelos murinos [64,65], mientras que, en humanos, el receptor de resistina recibe el nombre de proteína 1 asociado a adenilil ciclasa (CAP1) [66]. Asimismo, se presentó evidencia donde resistina compite por la unión a los receptores TLR4 con el lipopolisacárido (LPS) [67]. No obstante, existe evidencia sobre el papel supresor de la señalización mediada por insulina en adipocitos mediante SOCS3 [67]. La descripción sobre el papel de resistina en el sistema inmune continúa en investigación, ya que en humanos presenta un papel más activo que en modelos murinos [68]. Existe controversia sobre los procesos que regula resistina, ya que la

literatura la presenta como una molécula proinflamatoria, mientras que otros la presentan con un papel distinto [69].

Los resultados de diversos estudios epidemiológicos han señalado la asociación entre obesidad y el incremento en la incidencia de una amplia variedad de distintos tipos de cáncer entre los que se encuentran el cáncer esofágico, gástrico, pancreático, hepático, colorrectal, mamario y prostático [14,61,70-72].

Los cambios en la adiposidad en los tejidos pueden regular distintos procesos asociados a la progresión tumoral, como la carcinogénesis. Sin embargo, actualmente los mecanismos que asocian la obesidad con la progresión tumoral no han sido completamente elucidados. La adiponectina, leptina y resistina han sido involucradas en la señalización celular autocrina y/o paracrina, debido a la caracterización de su papel en los mecanismos de la iniciación, progresión, regresión y persistencia tumoral [73,74]. Entre ellas, la resistina emerge como una molécula muy importante implicada en el diagnóstico, pronóstico y patofisiología del cáncer [13,61].

#### **IV.2. Receptores tipo Toll y su interacción con resistina**

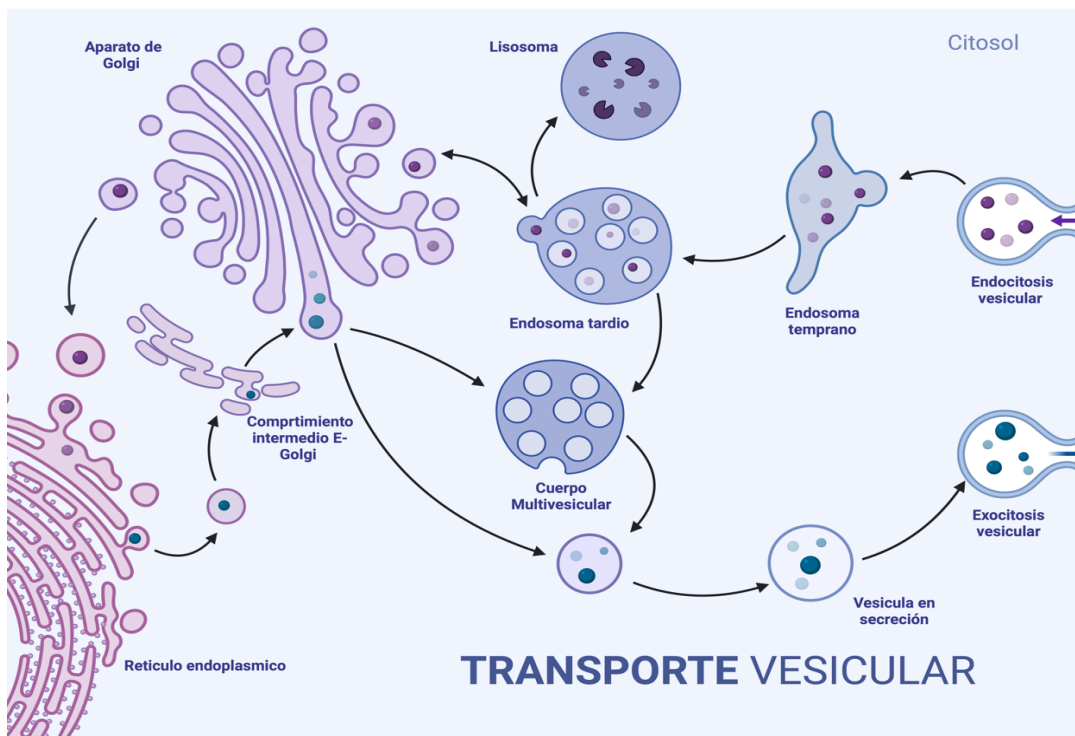
Los receptores tipo toll son característicos por censar y reconocer moléculas en la superficie celular, en los mamíferos se han descrito 13 receptores homólogos a toll [75]. Específicamente, los TLR4 son capaces de reconocer el lipopolisacárido (LPS) y proteínas de choque térmico HSP60 y HSP70 [76,77]. Incluso, existe evidencia sobre la excitación de TLR4 mediante la activación y dimerización con TRL2 favoreciendo río abajo la vía TLR4/NFκB [78]. Se han descrito vías de transducción que son mediadas por resistina en diversos tipos de células tumorales, entre las que se incluyen señalización a través de receptores tipo toll 4 (TLR4), y la activación de la vía PI3K/Akt/NFκB [79-81]. La activación de estas vías puede ocasionar que se mantenga un estado inflamatorio crónico a través de la secreción constante de citocinas pro-inflamatorias, lo cual puede conducir a un estado cancerígeno. Las citocinas a su vez pueden activar vías específicas como las MAPKs y JAK/STAT

que promoverán respuestas celulares como la proliferación tumoral [13,82,83]. Así mismo, resistina induce la activación de PI3K concomitante con la fosforilación de Akt, resultando en un incremento de la proliferación celular en diferentes tipos de líneas celulares tumorales [13,14,84,85].

Por otro lado, un estudio de metaanálisis demostró que niveles elevados de resistina en suero/plasma se relacionan a un riesgo elevado de desarrollar diversos tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama y cáncer prostático [61]. En este sentido, mediante ensayos de inmunohistoquímica realizados en pacientes coreanos que fueron diagnosticados con cáncer de próstata, se demostró que los niveles de expresión de resistina se encuentran elevados en tejido tumoral prostático de alto grado, mientras que en tejido de bajo grado o con hiperplasia benigna prostática, la expresión de resistina fue mucho menor. Además, en células de la línea epitelial prostática no tumoral RWPE-1 y en las líneas tumorales prostática PC3 (alto potencial invasivo y metastásico) y DU-145 (moderado potencial invasivo) se demostró la expresión de mRNA del gen de resistina, en donde de manera importante, encontraron una mayor expresión del mRNA en la línea tumoral PC3 con respecto a las líneas RWPE-1 y DU-145. Adicionalmente, se presentó evidencia sobre la estimulación de células de las líneas tumorales PC3 y DU-145 con resistina, demostrando que dicha interacción promueve la proliferación celular a través de la activación de la vía PI3K/Akt [86]. Aunado a lo anterior, ensayos de tipo *in vitro* han utilizado como modelo la línea tumoral mamaria invasiva MDA-MB-231, demostrando que el estímulo con resistina promueve los procesos de migración e invasión celular a través de la activación de la vía de señalización ERM acompañado del incremento en la expresión de vimentina, promoviendo eventos celulares importantes como la metástasis [87].

### IV.3 Vesículas extracelulares y su papel en cáncer

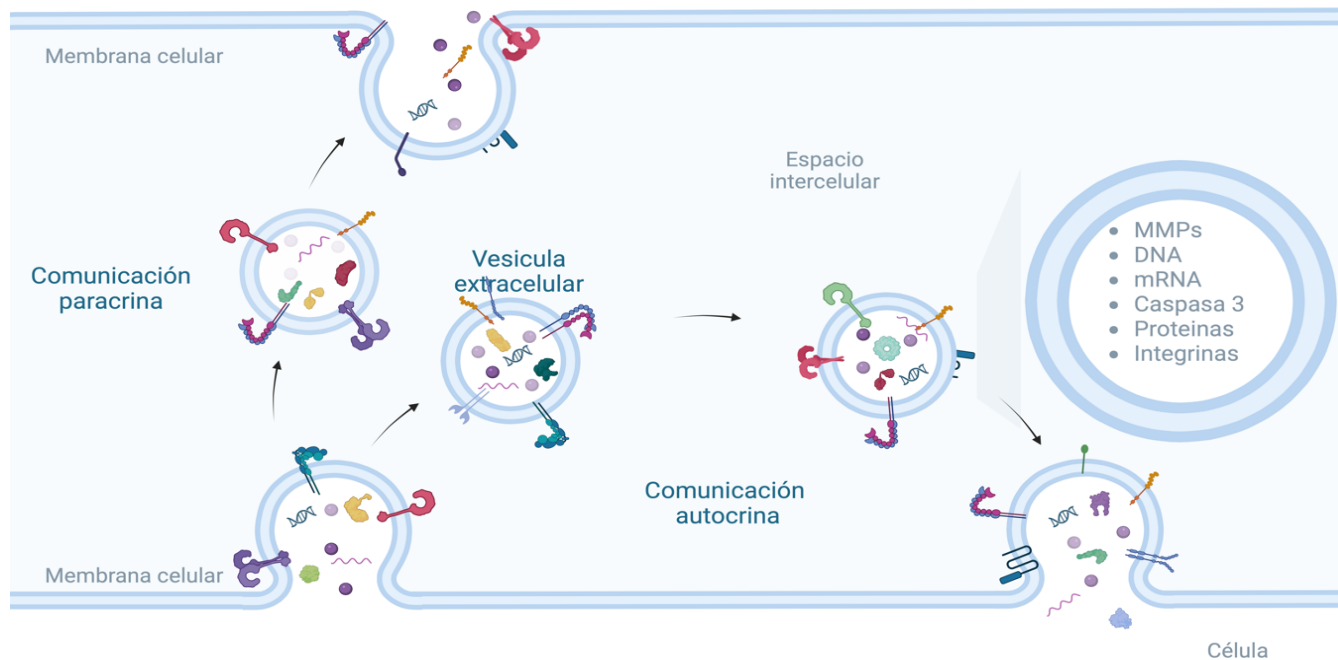
Las VEs son un grupo heterogéneo de estructuras membranosas comprendidas por múltiples moléculas cargo [88]. Han sido encontradas en fluidos corporales como en la secreción nasal, saliva, leche materna, orina y sangre [88]. Pueden contener moléculas cargo que fueron endocitadas (Figura 3), además de ser secretadas por casi todo tipo de células participando en la comunicación autocrina, paracrina o endocrina (Figura 4) [89]. Hasta hace poco, se habían definido al menos tres poblaciones de VEs: cuerpos apoptóticos (50-4000 nm), microvesículas o ectosomas (100-1000 nm) y los exosomas (50-150 nm) [90]. Sin embargo, evidencia más reciente exhibe una población más pequeña llamada exomeros (30-50 nm), los cuales carecen de membrana [91].



**Figura 3. Biogénesis de las vesículas extracelulares.**

Las moléculas endocitadas pueden ser transportadas mediante vesículas del endosoma temprano hacia el endosoma tardío para su posterior degradación en el lisosoma. Algunas de las vesículas serán transportadas hacia el Golgi o retículo endoplasmático para culminar en el cuerpo multivesicular. Finalmente, el material cargo es transportado en vesículas extracelulares para su exocitosis (Figura adaptada de Kirsten Ebanks. Frontiers. 2020).

La secreción de VEs es un proceso constitutivo presente en múltiples tipos de líneas celulares, sin embargo, estímulos exógenos como epinefrina, adenosina difosfato, colágeno, factor de crecimiento epidérmico, ácido linoleico o calcio inducen un aumento en la secreción, así como la expresión diferencial de moléculas asociadas a VEs [92-95]. Las VEs secretadas por células tumorales se han relacionado a distintas etapas de la progresión tumoral como proliferación, migración, invasión, angiogénesis metástasis y resistencia a la quimioterapia [96-98]. En todos estos procesos, las moléculas presentes como carga en la VEs son las responsables de promover las diferentes etapas del desarrollo tumoral, entre las que se encuentran proteínas, lípidos, miRNA, mRNA y DNA [99]. Dada dicha información es por lo que la composición y función de las VEs como paquetes de información intercelular depende en gran medida de diversos factores presentes en el microambiente tumoral (citocinas, hormonas, factores de crecimiento, adipocinas, etc.) [100-103]. La posible relación entre resistina y la secreción de VEs se sustenta en la evidencia presentada donde el tratamiento de células invasivas mamarias MDA-MB-231 con resistina induce incrementos en la concentración de calcio intracelular [86]. Siendo este evento uno de los principales inductores de la secreción de microvesículas y exosomas [92-95,100,101,103].



**Figura 4. Captación autocrina y paracrina de moléculas cargo mediante vesículas extracelulares.**

Metaloproteinasas (MMPs), material genético (DNA y mRNA), moléculas asociadas a la apoptosis celular (caspasa 3), cinasas de adhesión focal-FAK (proteínas) y moléculas de adhesión celular (integrinas).

## V. Justificación

Estudios epidemiológicos y patológicos han demostrado que la prevalencia de la neoplasia intraepitelial prostática (NIP) es similar entre diferentes poblaciones a pesar de las enormes diferencias geográficas, tanto en las tasas de incidencia como en las de mortalidad por cáncer prostático. En el cáncer de próstata es prioridad identificar los factores moleculares mediante los cuales las células tumorales prostáticas progresan de tumores no invasivos a neoplasias agresivas, con la finalidad de evitar el sobretratamiento de la enfermedad y mejorar la calidad de vida a fin de evitar la extirpación de la próstata. Factores relacionados al estilo de vida como la dieta y la obesidad, juegan un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer prostático [104]. En México, la obesidad es un problema de salud pública nacional, con altos niveles de prevalencia en adultos mayores de 18 años y niños de 2-18 años, lo cual se asocia a un incremento en el riesgo de desarrollar neoplasias malignas [102,105]. La obesidad implica la acumulación de tejido adiposo, y la subsecuente alteración en el perfil de adipocinas secretadas puede contribuir a incrementar el riesgo de presentar neoplasias malignas. El papel de leptina y adiponectina en cáncer de próstata ha sido parcialmente demostrado [106]. Por otro lado, la contribución de la adipocina resistina en las etapas de progresión tumoral prostática no ha sido estudiada. Por lo tanto, surge la necesidad de caracterizar el papel de resistina en los procesos de migración e invasión tumoral prostática, debido a que actualmente no existen estudios que demuestren la participación de esta adipocina en los procesos anteriormente mencionados. Así mismo, es particularmente importante evaluar su posible implicación en la secreción de VEs con moléculas cargo que promuevan eventos celulares como proliferación, migración, invasión y metástasis tumoral. Los datos mencionados anteriormente relacionan a la adipocina resistina como un factor importante en la progresión tumoral, sin embargo, se necesita evidencia *in vitro* que soporte su participación en los procesos de migración e invasión tumoral, así como en la secreción de VEs con la finalidad de que a futuro sea considerada un blanco terapéutico antineoplásico para el tratamiento de la enfermedad.

## **VI. Hipótesis**

La resistina, mediante su unión al TLR4, induce la activación de FAK, favoreciendo la migración e invasión de las células tumorales prostáticas. Además, resistina promueve la secreción de VEs de células PC3 que regulan los procesos de migración e invasión tumoral de esta línea celular.

## **VII. Objetivos**

### **VII.1. Objetivo General**

Estudiar la participación de resistina como promotor de los procesos de migración e invasión de células PC3, así como la secreción de VEs en células de cáncer prostático PC3.

### **VII.2. Objetivos particulares**

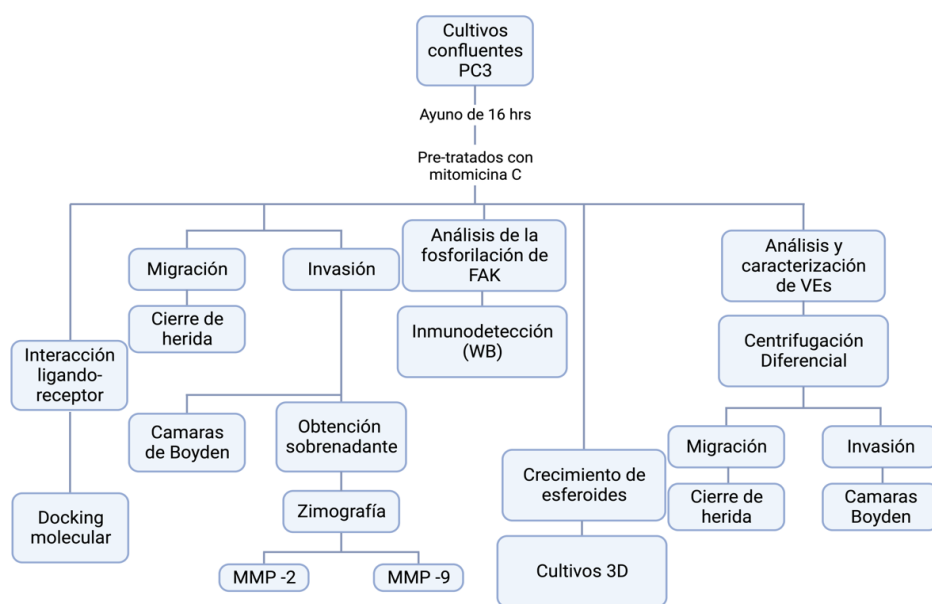
- 1.- Determinar el efecto de resistina sobre la capacidad de migración en células tumorales prostáticas PC3
- 2.- Evaluar los niveles de fosforilación de FAK (p-FAK-Tyr<sup>397</sup>) en células cancerosas prostáticas PC3 tratadas con resistina.
- 3.- Analizar el efecto de la resistina sobre la secreción de las MMP-2 y -9 en células PC3.
- 4.- Estudiar la capacidad invasiva de células tumorales PC3 estimuladas con resistina.
- 5.- Evaluar el efecto de la resistina en un modelo esferoide conformado por células tumorales prostáticas PC3.
- 6.- Determinar cómo el estímulo con resistina en células cancerosas prostáticas promueve un aumento en la secreción de VEs, así como un incremento en la asociación de moléculas cargo como MMP-9 a VEs presentes en medios condicionados.

7.- Estudiar el efecto de las VEs aisladas de cultivos celulares de la línea PC3 tratadas con resistina sobre la migración e invasión de células PC3.

## VIII. Materiales y métodos

Para el desarrollo de la presente propuesta se realizó la siguiente estrategia metodológica, esquematizada en la Figura 5. Se utilizó como modelo la línea tumoral prostática PC3, insensible a andrógenos PC3 evaluando el papel de la resistina en el cáncer prostático insensible a hormonas (hormono-refractario). En este modelo celular, en primera instancia se determinó el papel de resistina en la migración e invasión celular mediante ensayos de cierre de herida y cámaras de Boyden recubiertas con Matrigel, respectivamente. A continuación, se caracterizó la activación de la cinasa de adhesión focal FAK mediada por resistina involucradas en migración e invasión a través de inmunodetección. Además de determinar el efecto de resistina en el crecimiento esferoide en un modelo 3D.

Así mismo, la secreción de VEs en células tumorales prostáticas bajo el tratamiento de resistina se determinó mediante el análisis de contenido proteico, el cual se realizó mediante inmunodetección. El análisis de la capacidad pro-migratoria y pro-invasiva de las VEs secretadas bajo el tratamiento con resistina de células tumorales fue evaluado mediante ensayos de cierre de herida y en cámaras de Boyden recubiertas con Matrigel utilizando cultivos de células tumorales prostáticas PC3.



**Figura 5.** Diagrama del diseño metodológico general del proyecto.

### VIII.1. Línea Celular

Material biológico	Características	Número de catálogo ATCC
PC3	Línea celular humana invasiva de cáncer prostático	CRL-1435

### VIII.2. Anticuerpos

Anticuerpo	Número de catálogo
Anti-FAK-Tyr <sup>397</sup>	Santa Cruz (sc-81493)
Anti-FAK	Santa Cruz (sc-271126)
Anti-Actina	Santa Cruz (sc-47778)
Anti-MMP-2 (H-76)	Santa Cruz (sc-10736)
Anti-MMP-9 (H-129)	Santa Cruz (sc-10737)
Anti-Flotilina 2	Santa Cruz (sc-74566)
Anti-CD63	Santa Cruz (sc-5275)
Anti-TLR4	Santa Cruz (sc-293072)
Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (HRP)	Santa Cruz (sc-2357)
Anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (HRP)	Thermo Fisher (A11001)
Anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa (HRP)	Santa Cruz (sc-2354)

La adipocina humana recombinante resistina se obtuvo de PreproTech. y el Matrigel fue obtenido de BD Biosciences®.

### **VIII.3. Cultivos celulares**

La línea celular tumoral prostática humana PC3 se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) y fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado con antibióticos, 10% de suero fetal bovino (SFB) y mantenidas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Para propósitos experimentales, los cultivos de células PC3 se sometieron a ayuno durante 16 horas en medio RPMI 1640 sin SFB.

### **VIII.4. Docking molecular**

Para realizar el análisis de docking molecular entre resistina y los receptores diana, se utilizó el programa Moe 2202.02. La estructura proteica de los receptores CAP1, TLR4 y de la adipocina resistina fueron obtenidos de Protein Data Bank (PDB): 1K8F crystal structure of the human c-terminal CAP1-adenylyl cyclase associated protein (PDB DOI: 10.2210/pdb1K8F/pdb), 3FXI Crystal structure of the human TLR4-human MD-2-E.coli LPS Ra complex (TLR4) (PDB DOI: 10.2210/pdb3FXI/pdb) y 1RGX crystal structure of resisitn (PDB DOI: 10.2210/pdb1RGX/pdb). Los PDB utilizados para el análisis fueron seleccionados debido a sus características, como lo fueron trabajos previos donde fueron utilizados, estructuras aisladas de humano, entre otras.

En el software Moe 2022.02 se estudió la interacción de los receptores CAP1 y TLR4 con resistina, los cuales, mediante dicho programa se analizó el acoplamiento, protonando y eliminando moléculas de agua para su posterior análisis. Se continuó con el acoplamiento molecular de los receptores CAP1 y TLR4 con resistina, seleccionando el E-Score menos negativo, para finalmente tomar el sitio de interacción entre proteínas y a la obtención de las replantaciones de la interacción entre receptor-ligando.

### **VIII.5. Ensayo de cierre de herida**

Para determinar si la adipocina resistina induce migración en células tumorales prostáticas, se realizaron ensayos de cierre de herida de acuerdo con el protocolo descrito previamente por *Galindo-Hernández O et al.* [101,103]. La línea celular PC3

es insensible al tratamiento con andrógenos, con lo que se evaluó si esta condición modula los efectos biológicos mediados por resistina. Para ello, cultivos confluentes de células tumorales prostáticas PC3 fueron ayunados en medio RPMI sin suero durante 16 horas y pre-tratados durante 2 horas con mitomicina C 12  $\mu$ M para inhibir la proliferación celular durante el experimento. Posteriormente, a los cultivos se les realizó una ralladura o herida en la monocapa de células con una punta para pipeta de 200  $\mu$ l. A continuación, las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de resistina (0, 10, 25, 50 y 100 ng/mL) durante 48 horas [87]. Posterior al estímulo con resistina las células fueron fijadas y teñidas. La migración resultante dentro de la herida fue fotografiada utilizando un microscopio invertido acoplado a cámara. El resultado positivo se presentó cuando las células tumorales migraron hacia el espacio generado en la ralladura.

#### **VIII.6. Ensayo de invasión en cámara de Boyden**

Para confirmar el papel de resistina en invasión celular, se exploró la capacidad de esta adipocina como inductora de invasión celular mediante ensayos en cámara de Boyden de acuerdo con su descripción en la literatura [101,103]. Los ensayos de invasión se realizaron en cámaras de Boyden con filtros que presentan un tamaño de poro de 8  $\mu$ m y que previamente fueron recubiertas con matrigel. Las células de la línea PC3 se sometieron a supresión sin suero durante 16 horas y fueron pre-tratadas con mitomicina C para inhibir la proliferación celular. Posteriormente, se colocaron 100,000 células en la parte superior de la cámara de Boyden y en la parte inferior del inserto se colocaron 500  $\mu$ L de medio con las concentraciones de resistina deseadas (0, 10, 25, 50 y 100 ng/mL) [87]. Las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C, transcurrido el tiempo de incubación estas se fijaron con metanol frío y fueron removidas de la parte superior todas las células que no invadieron. Una vez realizado este procedimiento, las células presentes en la parte inferior fueron teñidas con cristal violeta, las células fueron fotografiadas con un microscopio acoplado a cámara y las imágenes obtenidas fueron analizadas y cuantificadas usando el programa ImageJ 1.44p. [107].

### **VIII.7. Inmunodetección**

Cultivos confluentes de células tumorales prostáticas PC3 fueron tratados con resistina a la concentración de 25 ng/mL en diferentes tiempos (10, 20, 30, 45 y 60 min) [87]. Al finalizar el tratamiento, los lisados celulares se obtuvieron con RIPA 1X y fueron cuantificados con el método de micro-bradford. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche al 5% durante 1 hora, para después colocar el anticuerpo correspondiente (dilución 1:400) e incubar durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo las membranas se lavaron 4 veces durante 15 minutos con PBS-Tween al 1% y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario especie-específico peroxidado (dilución 1:5000) durante 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de 4 lavados durante 15 minutos con PBS-Tween al 1% y revelando mediante electro quimioluminiscencia (ECL). Las autorradiografías fueron escaneadas y las bandas cuantificadas usando el programa ImageJ 1.44p.

### **VIII.8. Zimografía**

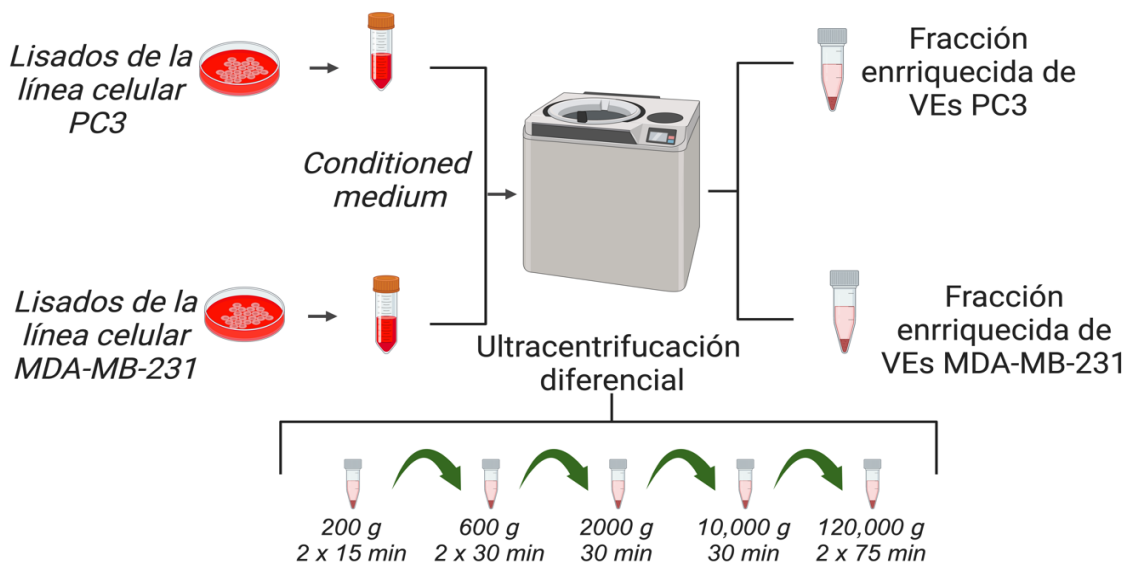
Para la determinación de la secreción de la MMP-2 y MMP-9, se realizó el ensayo de zimografía. Brevemente, cultivos confluentes de las líneas celulares tumorales prostáticas fueron estimulados con 25 ng/mL de resistina [87] durante 48 horas, momento en que los medios condicionados fueron colectados y concentrados con filtros centricon. A continuación, volúmenes iguales de medio condicionado concentrado fueron cargados en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina a 1 mg/mL. Posteriormente, los geles se lavaron e incubaron en buffer de activación de metaloproteinasas. Finalmente, los geles fueron fijados y teñidos con Azul de Coomassie Brillante G-250. La actividad proteolítica fue detectada como bandas claras sobre fondo teñido de sustrato no degradado.

### **VIII.9. Ensayo de crecimiento de esferoides (cultivo 3D).**

El desarrollo del ensayo de esferoides se basó en el protocolo de Saraiva et al. [143] con algunas modificaciones. Se recubrieron placas de 24 pocillos con agarosa al 1,5% disuelta en PBS 1X (400 µl/pocillo). Se tripsinizaron cultivos de células PC3 (90% de confluencia) y la suspensión celular ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) se colocó en los pocillos recubiertos de agarosa. Los esferoides se cultivaron en las condiciones indicadas (DMEM con 5% de FBS solo o DMEM suplementado con 25 ng/mL de resistina + 5% de FBS) durante siete días, cambiando el medio fresco cada 48 h. Durante el experimento, se tomaron fotografías los días 3, 5 y 7 con un microscopio acoplado a una cámara. El área de los esferoides se analizó con el software ImageJ (Bethesda, MD; versión 1.54c). Para cada punto temporal, se promedió el área de cuatro esferoides. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student.

### **VIII.10. Aislamiento y caracterización de VEs**

Las VEs secretadas por células tumorales prostáticas tratadas con resistina a la concentración de 25 ng/mL [87] fueron aisladas del medio condicionado mediante la técnica de ultracentrifugación diferencial según describe *Galindo-Hernández O et al.* Una vez obtenida la fracción enriquecida en VEs (exosomas y MVs), el contenido proteico de las mismas fue evaluado mediante inmunodetección utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas de interés como CD63 y Flotilina-2. La posible capacidad pro-migratoria o pro-invasiva inducida únicamente por VEs derivadas de células tumorales prostáticas estimuladas con resistina fue evaluada mediante ensayos de cierre de herida y ensayos en cámara de Boyden utilizando cultivos de células tumorales (PC3) siguiendo la estrategia experimental descrita anteriormente. En estos ensayos, la concentración de proteína se determinó mediante micro Bradford y la estimulación de los cultivos en todos los casos fue de 30 µg de proteínas derivadas de la fracción enriquecida con VEs por cada mL medio RPMI 1640.



**Figura 6. Diagrama del diseño metodológico general del proceso de ultracentrifugación diferencial.**

### VIII.11. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$ D.E. Los datos fueron analizados estadísticamente usando la prueba ANOVA de una vía comparada mediante la prueba múltiple de Dunnett y t student en el software GraphPad Prims 10.0.3. La probabilidad estadística  $P < 0.05$  fue considerada significativa.

## **IX. Aspectos éticos, normativos y de seguridad**

El presente estudio se desarrolló, hasta su conclusión, con apego a las disposiciones legales de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

## **X. Resultados**

### **X.1 Docking molecular sobre la interacción de CAP1 o TLR4 con Resistina.**

En nuestra investigación se aborda el efecto que tiene resistina en las células PC3 sobre la progresión tumoral prostática. Debido a esto, se realizaron una serie de pruebas de docking molecular entre resistina y los receptores CAP1 y TLR4, encontrando el grado de interacción entre dichos receptores y resistina para dilucidar la interacción probable.

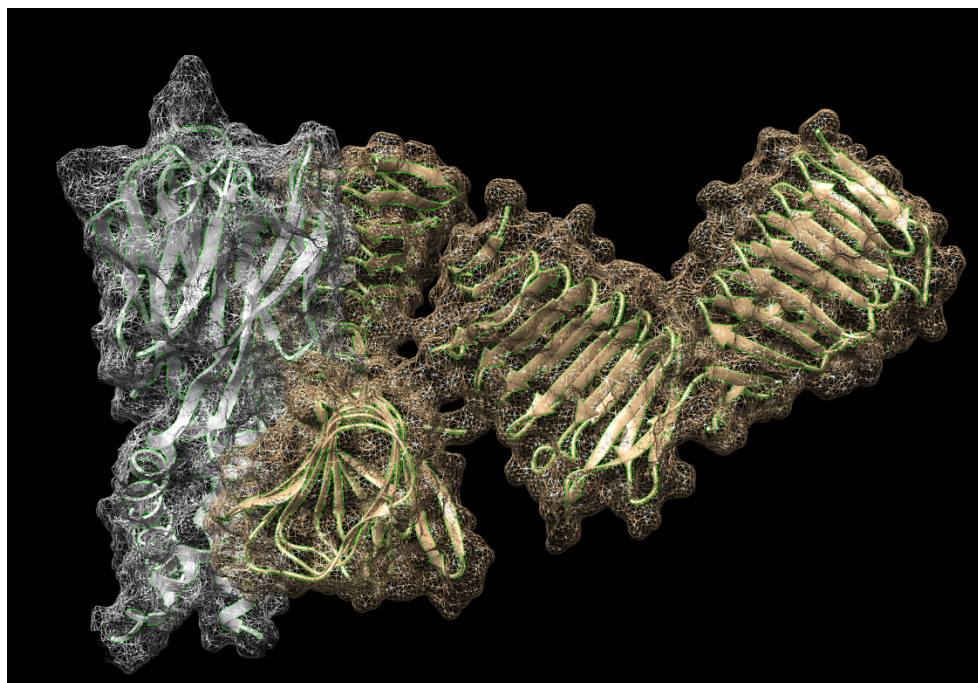
#### **X.1.1 Docking molecular Resistina vs CAP1.**

Mediante el programa Moe 2022.02, se realizó el análisis de docking molecular. En la tabla 1 se pueden observar las 3 interacciones con mayor afinidad entre el receptor CAP1 y resistina, el menor valor obtenido fue de un E-Score de -77.7155 kcal/mol representando la mayor afinidad en la región C-terminal de CAP 1 entre los residuos de Glu325-Gly475 con Resistina entre los residuos de Lys29-Ser94, representado en la figura 6, por otro lado, en la figura 7 se muestra la segunda interacción con mayor afinidad en la región C-terminal de CAP 1 entre los residuos de Lys366-Gly475 con Resistina entre sus residuos de Cys6-Trp82 presentando un E-Score de -71.8582, y en la figura 8 describe la interacción con la tercera afinidad más importante en la región C-terminal de CAP1 entre los residuos de Asp296-Glu455 con Resistina entre sus residuos de Cys6-Val138 con un E-Score de -70.1474.

**Tabla 1.** Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre resistina y el receptor CAP1.

#	Análisis	E-Score (kcal/mol)
Docking 1	CAP1 - Resistina	-77.7155
Docking 2	CAP1 - Resistina	-71.8582
Docking 3	CAP1- Resistina	-70.1474

#### X.1.1.1. Docking molecular número 1 CAP1 contra Resistina



**Figura 7. Docking molecular número 1 del receptor CAP1 (color bronce) y Resistina (color blanco).**

La figura representa el análisis en tercera dimensión de la interacción con mayor afinidad (E-score: -77.7155 kcal/mol).

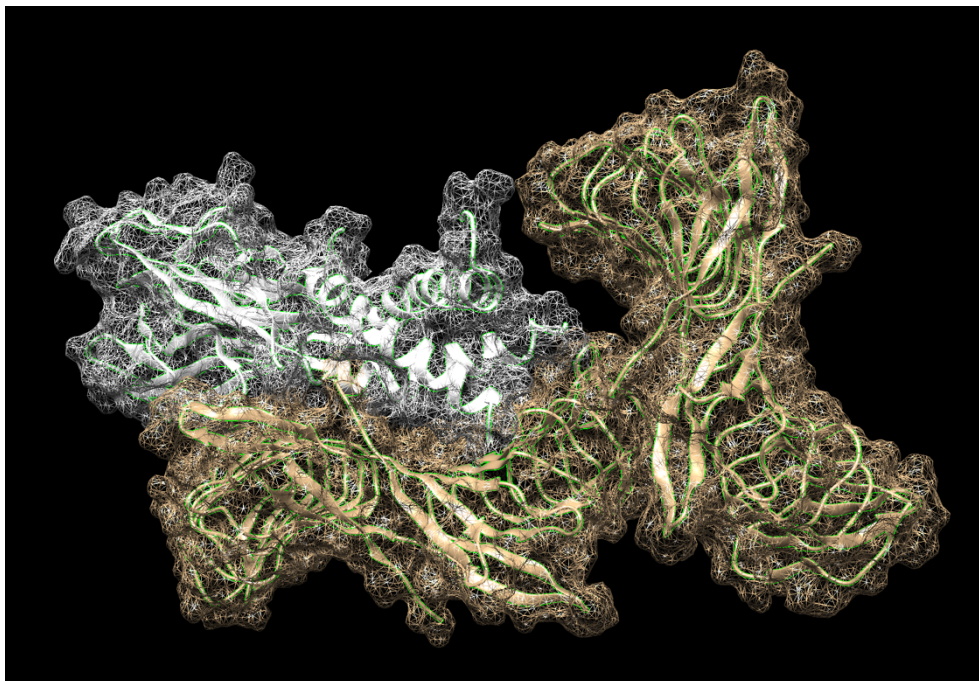
**Tabla 2.** Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 1 entre CAP1 y Resistina.

CAP1 – Resistin Docking 1						
#	Tipo	Cadena CAP-1	Aminoácido	Cadena Resistina	Aminoácido	Energía
1	DHI	1K8F. A	Asp373	1RGX. B	Lys29	-21.75
2	DHI	1K8F. A	Lys395	1RGX. C	Glu49	-13.19
3	DHI	1K8F. B	Gly475	1RGX. A	Lys29	-5.26
4	DI	1K8F. B	Lys376	1RGX. C	Glu70	-7.02
5	DI	1K8F. B	Lys395	1RGX. C	Glu69	-0.29
6	DH	1K8F. A	Glu325	1RGX. C	Ser94	-2.30
7	DH	1K8F. B	Asn336	1RGX. B	Arg41	-0.43
8	DH	1K8F. B	Lys377	1RGX. B	Thr37	0.65
9	DH	1K8F. A	Lys327	1RGX. B	Asn21	0.00
10	D	1K8F. B	Asn358	1RGX. B	Ser39	0.20
11	D	1K8F. A	Asn368	1RGX. B	Ser22	47.70
12	D	1K8F. A	Asn368	1RGX. B	Asn26	0.00
13	D	1K8F. A	Ser369	1RGX. B	Asn26	2.54
14	D	1K8F. A	Thr371	1RGX. B	Lys29	-1.00
15	D	1K8F. A	Asp373	1RGX. C	Lys89	-0.00
16	D	1K8F. A	Asn374	1RGX. C	Pro48	-0.15
17	D	1K8F. B	Lys374	1RGX. C	Glu49	40.70
18	D	1K8F. A	Asn374	1RGX. C	Gly50	0.20
19	D	1K8F. B	Asn374	1RGX. C	Gly69	2.97
20	D	1K8F. B	Lys376	1RGX. C	Ile67	-0.14
21	D	1K8F. B	Lys376	1RGX. C	Glu69	0.19
22	D	1K8F. B	Lys377	1RGX. B	Trp36	0.54
23	D	1K8F. B	Lys377	1RGX. C	Glu70	0.00
24	D	1K8F. A	Ile388	1RGX. B	Asn26	27.16
25	D	1K8F. A	Glu390	1RGX. B	Asn26	-0.10
26	D	1K8F. A	Gln390	1RGX. B	Lys29	-0.26
27	D	1K8F. A	Asn393	1RGX. C	Glu49	1.09
28	D	1K8F. A	Asn393	1RGX. C	Gly50	0.74
29	D	1K8F. B	Lys395	1RGX. C	Glu70	-1.67

30	D	1K8F. B	Asp396	1RGX. B	Trp36	-0.08
31	D	1K8F. B	Asp396	1RGX. C	Glu70	0.03
32	D	1K8F. A	Asn411	1RGX. B	Ala93	14.98
33	D	1K8F. A	Asn411	1RGX. B	Ser94	-0.22
34	D	1K8F. A	Val430	1RGX. B	Ser94	-0.39
35	D	1K8F. A	Ala432	1RGX. B	Ala93	-0.00
36	D	1K8F. A	Ala432	1RGX. B	Ala93	-0.02
37	D	1K8F. B	Glu436	1RGX. B	Asn34	-0.25
38	D	1K8F. B	Gln456	1RGX. B	Ala93	0.00
39	D	1K8F. B	Gln456	1RGX. B	Ser94	3.53

D	H	I
Distancia	H-Unión	Iónico

### X.1.1.2. Docking molecular número 2 CAP1 contra Resistina



**Figura 8. Docking molecular número 2 del receptor CAP1 (color bronce) y Resistina (color blanco).**

La figura representa el análisis en tercera dimensión de la segunda mejor interacción con mayor afinidad (E-score: -71.8582 kcal/mol).

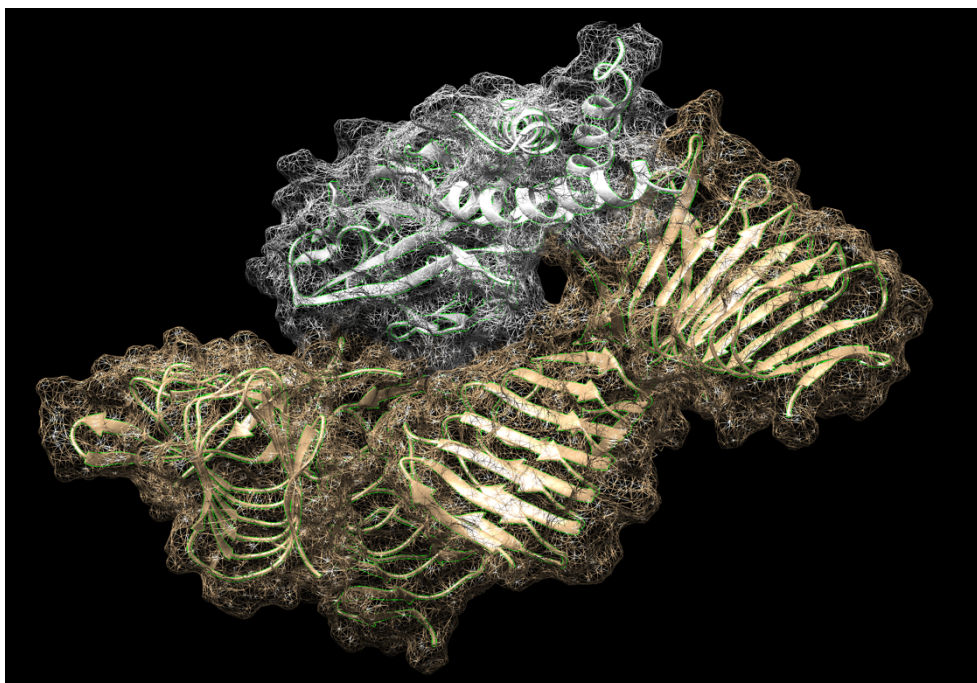
**Tabla 3.** Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 2 entre CAP1 y Resistina.

CAP1 – Resistin Docking 2						
#	Tipo	Cadena CAP-1	Aminoácido	Cadena Resistina	Aminoácido	Energía
1	IH	1K8F. D	Lys366	1RGX. C	Glu69	-1.98
2	IH	1K8F. C	Glu450	1RGX. A	Lys17	-3.57
3	DIH	1K8F. A	Asp447	1RGX. C	Lys43	-3.26
4	DI	1K8F. A	Glu444	1RGX. C	Arg79	-2.77
5	DI	1K8F. B	Lys465	1RGX. B	Asp81	6.22
6	DH	1K8F. B	Gln464	1RGX. C	Cys77	-1.32
7	D	1K8F. D	Pro406	1RGX. C	Glu49	0.07
8	D	1K8F. C	Tyr419	1RGX. A	Cys6	-0.60
9	D	1K8F. C	Tyr419	1RGX. A	Glu10	0.00
10	D	1K8F. D	Asp426	1RGX. C	Glu49	-0.45
11	D	1K8F. D	Asp426	1RGX. C	Lys71	0.60

12	D	1K8F. D	Glu428	1RGX. C	Glu49	-0.01
13	D	1K8F. C	Thr443	1RGX. B	Gln18	-0.49
14	D	1K8F. A	Thr443	1RGX. C	Lys43	0.58
15	D	1K8F. A	Thr443	1RGX. C	Ala78	-0.11
16	D	1K8F. C	Gly446	1RGX. A	Cys6	-0.01
17	D	1K8F. C	Gly446	1RGX. A	Asp9	0.03
18	D	1K8F. C	Asp447	1RGX. A	Asp9	-0.08
19	D	1K8F. C	Asp447	1RGX. B	Lys15	0.92
20	D	1K8F. C	Phe448	1RGX. A	Cys6	-1.49
21	D	1K8F. C	Phe448	1RGX. A	Asp9	-0.16
22	D	1K8F. C	Phe448	1RGX. B	Lys15	0.00
23	D	1K8F. C	Asn449	1RGX. B	Gln18	16.75
24	D	1K8F. C	Asn449	1RGX. B	Asp19	0.05
25	D	1K8F. A	Asn449	1RGX. C	Lys43	-0.50
26	D	1K8F. A	Asn449	1RGX. C	His74	-0.21
27	D	1K8F. C	Glu450	1RGX. A	Asp13	-0.01
28	D	1K8F. A	Glu450	1RGX. C	Arg68	0.65
29	D	1K8F. C	Phe451	1RGX. B	Ser22	-0.79
30	D	1K8F. C	Leu460	1RGX. C	Glu49	-0.39
31	D	1K8F. B	Gly463	1RGX. C	Ala78	0.00
32	D	1K8F. B	Gln464	1RGX. B	Ser60	0.07
33	D	1K8F. B	Gln464	1RGX. B	Ala61	0.43
34	D	1K8F. B	Gln464	1RGX. C	Ser64	-0.01
35	D	1K8F. B	Gln464	1RGX. C	Gln76	0.03
36	D	1K8F. B	Lys465	1RGX. B	Arg41	0.15
37	D	1K8F. B	Lys465	1RGX. B	Trp82	9.15
38	D	1K8F. C	Glu472	1RGX. B	Asn26	1.29
39	D	1K8F. C	Glu472	1RGX. B	Lys29	-0.26
40	D	1K8F. A	Glu472	1RGX. B	Arg41	5.39
41	D	1K8F. C	Ile473	1RGX. B	Asn26	-0.06
42	D	1K8F. C	Ala474	1RGX. B	Leu23	-1.19
43	D	1K8F. C	Ala474	1RGX. B	Asn26	4.76
44	D	1K8F. C	Gly475	1RGX. A	Lys17	0.29
45	D	1K8F. C	Gly475	1RGX. A	Asn21	-0.13
46	D	1K8F. C	Gly475	1RGX. B	Leu23	0.89
47	D	1K8F. A	Gly475	1RGX. C	Glu69	-0.00

D	H	I
Distancia	H-Unión	Iónico

### X.1.1.3. Docking molecular número 3 CAP1 contra Resistina



**Figura 9. Docking molecular número 3 del receptor CAP1 (color bronce) y Resistina (color blanco).**

La figura representa el análisis en tercera dimensión de la tercera mejor interacción con mayor afinidad (E-score: -70.1474 kcal/mol). En la figura se muestra el análisis en 3D.

**Tabla 4.** Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 3 entre CAP1 y Resistina

CAP1 – Resistin Docking 3						
#	Tipo	Cadena CAP-1	Aminoácido	Cadena Resistina	Aminoácido	Energía
1	I	1K8F. C	Lys376	1RGX. C	Ser94	-1.43
2	DI	1K8F. D	Lys327	1RGX. B	Glu10	98.0
3	DI	1K8F. C	Asp396	1RGX. B	Lys29	-1.38
4	DH	1K8F. C	Ser338	1RGX. C	Val138	-1.55
5	DH	1K8F. C	Lys398	1RGX. C	Glu49	-0.11
6	DH	1K8F. C	Gln400	1RGX. C	Glu49	-0.63
7	D	1K8F. D	Lys327	1RGX. B	Cys6	0.40
8	D	1K8F. C	Asn336	1RGX. A	Glu70	0.02
9	D	1K8F. C	Ser338	1RGX. C	Trp36	0.31

10	D	1K8F. C	Ser338	1RGX. C	Thr37	-0.31
11	D	1K8F. C	Ser338	1RGX. C	Ser39	0.05
12	D	1K8F. C	Asn339	1RGX. C	Ser39	-0.03
13	D	1K8F. D	Lys348	1RGX. B	Pro7	10.44
14	D	1K8F. D	Lys348	1RGX. B	Glu10	0.04
15	D	1K8F. D	Val350	1RGX. B	Glu10	-0.41
16	D	1K8F. C	Asn358	1RGX. C	Trp36	-0.06
17	D	1K8F. C	Asn358	1RGX. A	Glu70	-0.01
18	D	1K8F. C	Thr360	1RGX. C	Trp36	0.00
19	D	1K8F. D	Asn368	1RGX. B	Pro7	0.52
20	D	1K8F. D	Asn368	1RGX. B	Glu10	-0.01
21	D	1K8F. D	Ser369	1RGX. B	Lys14	0.07
22	D	1K8F. C	Lys377	1RGX. C	Ans34	-0.16
23	D	1K8F. C	Lys377	1RGX. C	Gln91	5.56
24	D	1K8F. D	Ile388	1RGX. B	Lys14	-1.64
25	D	1K8F. D	Ile388	1RGX. B	Gln18	-0.34
26	D	1K8F. D	Glu390	1RGX. B	Lys14	-0.04
27	D	1K8F. D	Glu390	1RGX. B	Gln18	-0.65
28	D	1K8F. C	Lys395	1RGX. C	Ser94	-0.36
29	D	1K8F. C	Asp296	1RGX. C	Gln91	-0.36
30	D	1K8F. C	Asp296	1RGX. C	Val92	0.01
31	D	1K8F. C	Asp296	1RGX. C	Ser94	-0.01
32	D	1K8F. C	Lys398	1RGX. C	Pro48	0.74
33	D	1K8F. D	Pro406	1RGX. A	Cys6	-0.27
34	D	1K8F. D	Thr407	1RGX. A	Cys6	-0.82
35	D	1K8F. C	His417	1RGX. B	Lys29	1.71
36	D	1K8F. C	Tyr419	1RGX. C	Glu49	-0.36
37	D	1K8F. C	Tyr419	1RGX. C	Gly50	0.15
38	D	1K8F. D	Glu428	1RGX. A	Cys6	-1.13
39	D	1K8F. C	Glu436	1RGX. B	Pro25	-1.31
40	D	1K8F. C	Glu436	1RGX. B	Asn26	-0.01
41	D	1K8F. C	Asn438	1RGX. B	Lys29	-0.01
42	D	1K8F. C	Phe448	1RGX. C	Glu49	5.42
43	D	1K8F. C	Glu450	1RGX. B	Lys29	-0.05
44	D	1K8F. C	Glu450	1RGX. B	Asn30	-0.04
45	D	1K8F. C	Glu450	1RGX. B	Ser94	0.01
46	D	1K8F. C	Glu455	1RGX. B	Asn26	0.02
47	D	1K8F. C	Ile473	1RGX. B	Leu23	-0.32
48	D	1K8F. C	Ile473	1RGX. B	Asn26	-1.73
49	D	1K8F. C	Ala474	1RGX. B	Leu23	-0.63

50	D	1K8F. C	Ala474	1RGX. B	Asn26	-0.02
51	D	1K8F. C	Gly475	1RGX. B	Leu23	0.12
52	D	1K8F. C	Gly475	1RGX. A	Phe24	-0.09
53	D	1K8F. C	Gly475	1RGX. B	Asn26	-0.18
54	D	1K8F. C	Gly475	1RGX. B	Ala27	-0.41

D	H	I
Distancia	H-Unión	Iónico

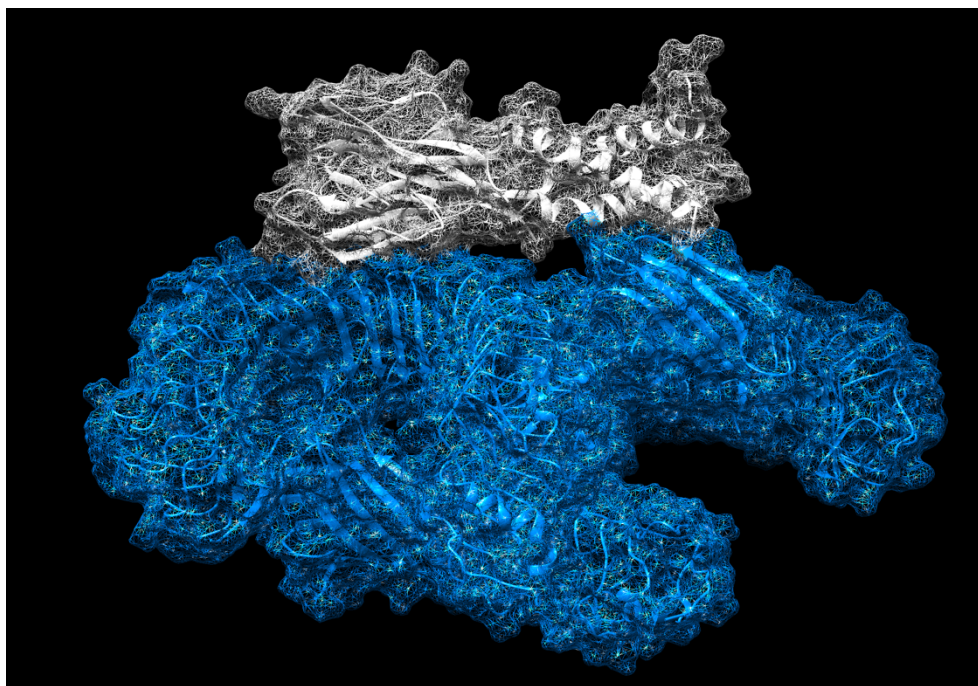
### X.1.2 Docking molecular Resistina vs TLR4.

Posteriormente, se realizó el análisis de docking molecular en el programa Moe 2022.02, entre el receptor TLR4 3FXI Crystal structure of the human TLR4-human MD-2-E.coli LPS Ra complex PDB (DOI: 10.2210/pdb3FXI/pdb) y resistina 1RGX crystal structure of resisitin (PDB DOI: 10.2210/pdb1RGX/pdb). En la tabla 5 se pueden observar las 3 interacciones con mayor afinidad entre el receptor TLR4 y resistina, el menor valor obtenido fue de un E-Score de -62.7696 kcal/mol representando la mayor afinidad, representado en la figura 9, por otro lado, en la figura 10 se muestra la segunda interacción con mayor afinidad, presentando un E-Score de -60.2131 y en la figura 11 describe la interacción con la tercera afinidad más importante con un E-Score de -58.3312.

**Tabla 5.** Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la resistina y el receptor TLR4.

#	Análisis	E-Score (kcal/mol)
Docking 1	TLR4 - Resistina	-62.7696
Docking 2	TLR4 - Resistina	-60.2131
Docking 3	TLR4 - Resistina	-58.3312

### X.1.2.1. Docking molecular número 1 TLR4 contra Resistina



**Figura 10. Docking molecular número 1 del receptor TLR4 (color azul) y Resistina (color blanco).**

La figura representa el análisis en tercera dimensión de la interacción con mayor afinidad (E-score: -62.7696 kcal/mol).

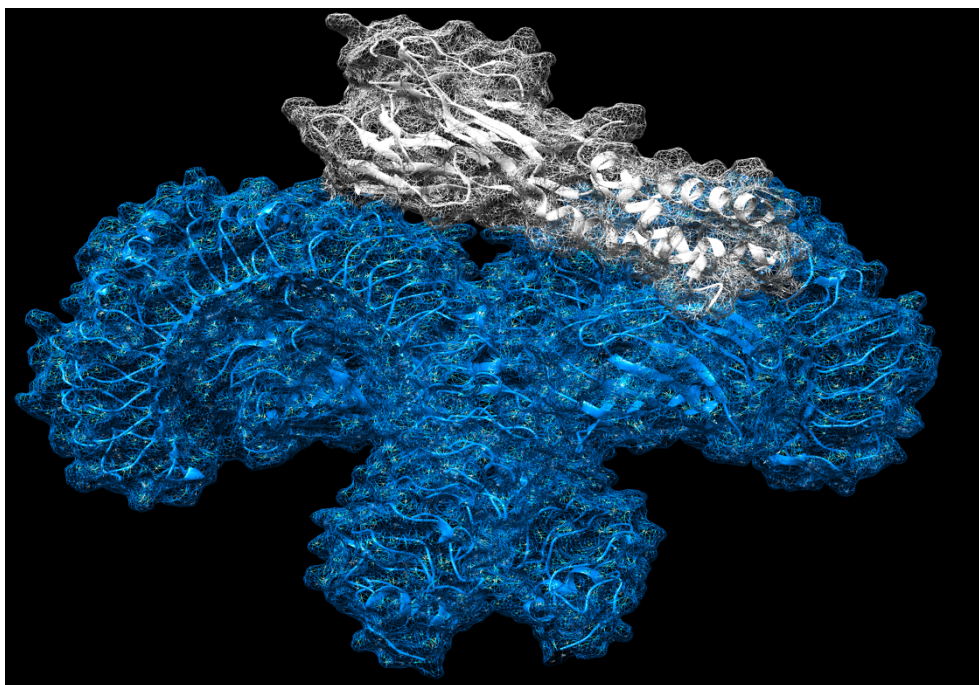
**Tabla 6.** Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 1 entre TLR4 y Resistina.

TLR4 – Resistin Docking 1						
#	Tipo	Cadena TLR4	Aminoácido	Cadena Resistina	Aminoácido	Energía
1	DIH	3FXI. B	Lys274	1RGX. B	Glu49	-2.73
2	DIH	3FXI. A	Glu278	1RGX. A	Arg41	-9.48
3	DH	3FXI. B	Lys186	1RGX. C	Met3	0.14
4	D	3FXI. D	Asn49	1RGX. B	Cys6	1.40
5	D	3FXI. D	Asn49	1RGX. B	Asp9	0.94
6	D	3FXI. D	Asn49	1RGX. C	Lys15	0.58
7	D	3FXI. D	Lys58	1RGX. C	Ser22	2.64
8	D	3FXI. D	Leu60	1RGX. C	Gln18	-1.20
9	D	3FXI. D	Ser118	1RGX. C	Gln18	0.60

10	D	3FXI. B	His159	1RGX. C	Met3	-0.93
11	D	3FXI. B	Asn160	1RGX. C	Met3	0.14
12	D	3FXI. B	Ser184	1RGX. C	Ser2	-0.06
13	D	3FXI. B	Ser184	1RGX. C	Met3	0.19
14	D	3FXI. B	Asn185	1RGX. C	Ser2	0.00
15	D	3FXI. B	Lys186	1RGX. C	Ser2	-0.00
16	D	3FXI. B	Leu212	1RGX. C	Ser2	-0.23
17	D	3FXI. B	Glu226	1RGX. C	Ser1	-0.42
18	D	3FXI. B	Glu226	1RGX. C	Ser2	-0.00
19	D	3FXI. B	Glu226	1RGX. C	Lys14	-0.13
20	D	3FXI. B	Gly267	1RGX. C	Lys14	0.44
21	D	3FXI. B	Glu270	1RGX. A	Asn26	21.71
22	D	3FXI. B	Lys271	1RGX. A	Asn26	-0.27
23	D	3FXI. A	Lys274	1RGX. A	Arg41	2.38
24	D	3FXI. A	Ser275	1RGX. A	Arg41	1.11
25	D	3FXI. A	Glu278	1RGX. A	Asp81	0.01
26	D	3FXI. B	Tyr295	1RGX. A	Ser94	-1.00
27	D	3FXI. B	Tyr296	1RGX. A	Ser94	-0.04
28	D	3FXI. B	Asp298	1RGX. A	Ala93	0.09
29	D	3FXI. B	Asp298	1RGX. A	Ser94	0.53
30	D	3FXI. A	Ile301	1RGX. A	Ser39	-0.79
31	D	3FXI. A	Asp302	1RGX. A	Ser39	0.85
32	D	3FXI. A	Asp302	1RGX. A	Ser40	-0.65
33	D	3FXI. A	Asp302	1RGX. A	Arg41	0.79
34	D	3FXI. A	Asn305	1RGX. A	Ser40	0.39
35	D	3FXI. A	Asn305	1RGX. A	Arg41	8.50
36	D	3FXI. B	Arg322	1RGX. A	Ala93	-0.40
37	D	3FXI. B	Arg322	1RGX. A	Ser94	17.60
38	D	3FXI. A	Tyr328	1RGX. A	Ser46	0.11

D	H	I
Distancia	H-Unión	Iónico

### X.1.2.2. Docking molecular número 2 TLR4 contra Resistina



**Figura 11. Docking molecular número 2 del receptor TLR4 (color azul) y Resistina (color blanco).**

La figura representa el análisis en tercera dimensión de la segunda mejor interacción con mayor afinidad (E-score: -60.2131kcal/mol).

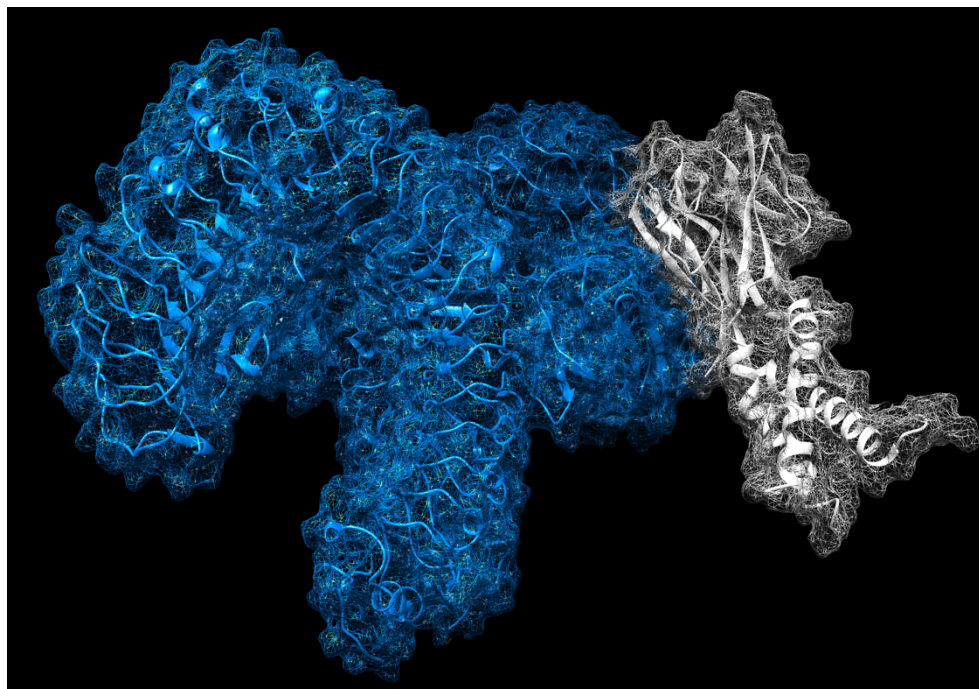
**Tabla 7.** Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 2 entre TLR4 y Resistina.

TLR4 – Resistin Docking 2						
#	Tipo	Cadena TLR4	Aminoácido	Cadena Resistina	Aminoácido	Energía
1	DIH	3FXI. A	Glu286	1RGX. C	Arg41	-379
2	DI	3FXI. A	Glu254	1RGX. C	Arg79	-2.84
3	DH	3FXI. D	Ser31	1RGX. A	Cys6	-0.75
4	D	3FXI. D	Asn26	1RGX. A	Cys6	1.31
5	D	3FXI. D	Asn26	1RGX. A	Asp9	-0.25
6	D	3FXI. D	Asn26	1RGX. B	Lys14	-0.00
7	D	3FXI. D	Asn27	1RGX. B	Lys15	-.027
8	D	3FXI. D	Asn27	1RGX. B	Gln18	1.70

9	D	3FXI. D	Ser28	1RGX. B	Gln18	0.35
10	D	3FXI. D	Ser28	1RGX. B	Asp19	-0.27
11	D	3FXI. D	Asp29	1RGX. B	Ser22	0.00
12	D	3FXI. D	Cys51	1RGX. B	Gln18	0.00
13	D	3FXI. D	Glu53	1RGX. B	Gln18	-1.20
14	D	3FXI. D	Glu53	1RGX. B	Ser22	0.00
15	D	3FXI. D	Lys55	1RGX. B	Asn21	-0.16
16	D	3FXI. D	Lys55	1RGX. B	Ser22	3.87
17	D	3FXI. D	Asn158	1RGX. A	Lys17	0.42
18	D	3FXI. D	Asn158	1RGX. B	Ser22	-0.06
19	D	3FXI. D	Asn158	1RGX. B	Leu23	-1.40
20	D	3FXI. A	Thr284	1RGX. C	Arg41	-0.13
21	D	3FXI. A	Thr284	1RGX. C	Arg79	0.20
22	D	3FXI. A	Thr284	1RGX. C	Asp81	-0.12
23	D	3FXI. A	Ile285	1RGX. C	Arg41	-0.48
24	D	3FXI. A	Glu286	1RGX. C	Ser40	-0.01
25	D	3FXI. A	Glu286	1RGX. C	Gly42	0.00
26	D	3FXI. A	Asn309	1RGX. C	Ser39	-0.03
27	D	3FXI. A	Asn309	1RGX. C	Ser40	-0.16
28	D	3FXI. A	Asn309	1RGX. C	Arg41	-0.05
29	D	3FXI. A	Asn309	1RGX. C	Trp82	-0.17
30	D	3FXI. A	Ser311	1RGX. C	Ser40	0.00
31	D	3FXI. A	Asn329	1RGX. A	Glu70	0.00
32	D	3FXI. A	Gly331	1RGX. C	Ser39	0.65
33	D	3FXI. A	Gly333	1RGX. C	Val38	-0.12
34	D	3FXI. A	Gly333	1RGX. C	Ser39	-0.02
35	D	3FXI. A	Lys351	1RGX. C	Trp36	0.32
36	D	3FXI. A	Ser352	1RGX. C	Trp36	0.02
37	D	3FXI. A	Ser352	1RGX. C	Thr37	-0.07
38	D	3FXI. A	Ser352	1RGX. C	Val38	-0.91
39	D	3FXI. A	Lys354	1RGX. C	Ser46	0.00
40	D	3FXI. A	Lys354	1RGX. C	Pro48	0.75
41	D	3FXI. A	Ser374	1RGX. C	Trp36	-0.21
42	D	3FXI. A	Ser374	1RGX. C	Pro48	-0.01

D	H	I
Distancia	H-Unión	Iónico

### X.1.2.3. Docking molecular número 3 TLR4 contra Resistina



**Figura 12. Docking molecular número 2 del receptor TLR4 (color azul) y Resistina (color blanco).**

La figura representa el análisis en tercera dimensión de la tercera mejor interacción con mayor afinidad (E-score: -58.3312 kcal/mol).

**Tabla 8.** Interacciones de los aminoácidos correspondientes del docking molecular número 3 entre TLR4 y Resistina.

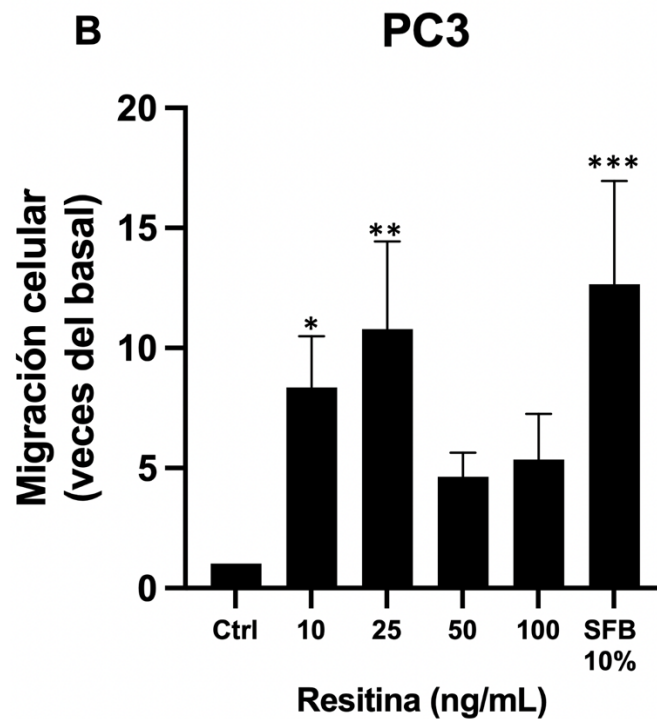
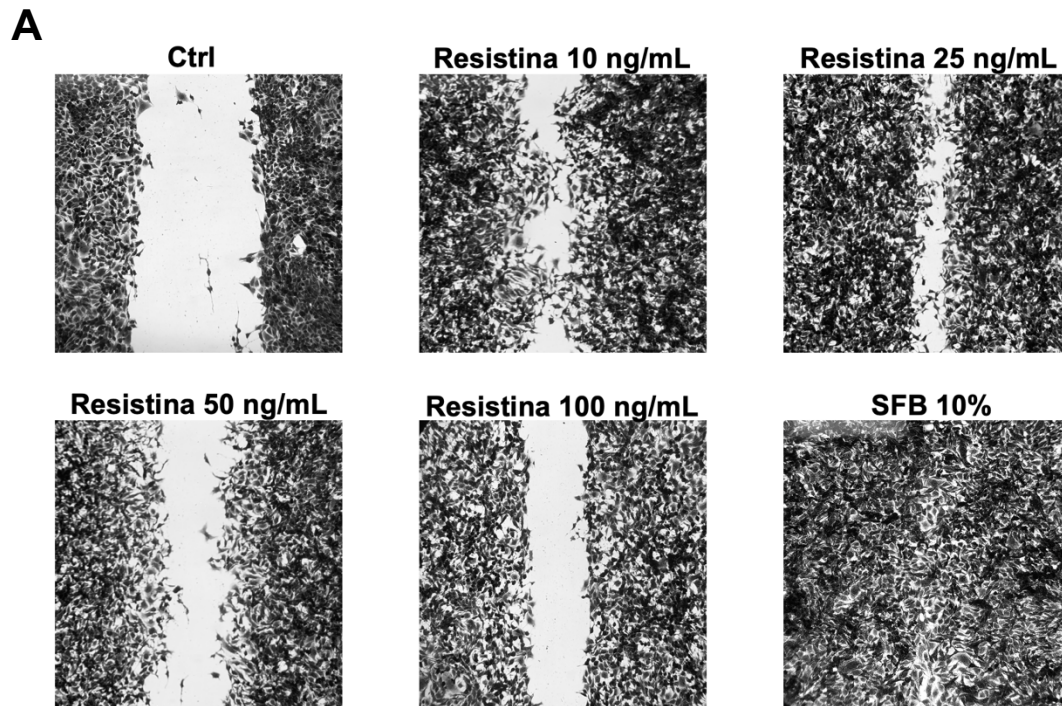
TLR4 – Resistin Docking 3						
#	Tipo	Cadena TLR4	Aminoácido	Cadena Resistina	Aminoácido	Energía
1	DIH	3FXI. B	Arg87	1RGX. A	Glu69	-4.94
2	DI	3FXI. D	Lys20	1RGX. C	Ser94	47.38
3	DI	3FXI. B	Asp238	1RGX. C	Arg79	0.77
4	D	3FXI. D	Ser45	1RGX. C	Trp36	0.11
5	D	3FXI. D	Asn47	1RGX. C	Trp36	2.87
6	D	3FXI. D	Asn47	1RGX. C	Pro48	0.43
7	D	3FXI. D	Asn49	1RGX. C	Pro48	0.43

8	D	3FXI. D	Asn49	1RGX. C	Glu49	0.36
9	D	3FXI. D	His62	1RGX. C	Thr37	-0.46
10	D	3FXI. D	His62	1RGX. C	Val38	1.39
11	D	3FXI. D	His62	1RGX. C	Ser39	5.63
12	D	3FXI. D	Ile66	1RGX. A	Glu69	0.03
13	D	3FXI. B	Arg87	1RGX. A	Arg68	1.78
14	D	3FXI. B	Gln91	1RGX. A	Leu44	-0.66
15	D	3FXI. B	Gly111	1RGX. A	Arg68	-0.04
16	D	3FXI. B	Asn112	1RGX. A	Arg68	0.08
17	D	3FXI. B	Pro113	1RGX. A	Arg68	0.68
18	D	3FXI. B	Gln115	1RGX. A	Gly42	0.40
19	D	3FXI. B	Gln115	1RGX. A	Lys43	0.89
20	D	3FXI. B	Gln115	1RGX. A	Leu44	19.67
21	D	3FXI. D	Asn114	1RGX. C	Thr37	4.48
22	D	3FXI. D	Asn114	1RGX. C	Ser39	0.08
23	D	3FXI. D	Thr116	1RGX. C	Ser39	-0.19
24	D	3FXI. B	Glu135	1RGX. A	Arg68	-0.56
25	D	3FXI. B	Asn137	1RGX. A	Lys43	87.93
26	D	3FXI. B	Asn137	1RGX. A	His74	107.26
27	D	3FXI. B	Ala139	1RGX. A	Lys43	1.54
28	D	3FXI. B	Ala139	1RGX. A	Ala78	0.40
29	D	3FXI. B	Leu161	1RGX. A	Lys43	-0.82
30	D	3FXI. B	Leu161	1RGX. A	His74	-1.01
31	D	3FXI. B	Leu161	1RGX. A	Gln76	38.97
32	D	3FXI. B	Gln163	1RGX. A	Ala78	15.04
33	D	3FXI. B	Lis186	1RGX. A	Gln76	1.25
34	D	3FXI. B	Lis186	1RGX. C	Asp81	-0.02
35	D	3FXI. B	Leu212	1RGX. C	Arg41	-1.02
36	D	3FXI. B	Pro214	1RGX. C	Arg79	0.23
37	D	3FXI. B	Pro214	1RGX. C	Asp81	-1.15
38	D	3FXI. B	Met215	1RGX. C	Arg79	-0.23
39	D	3FXI. B	Asn216	1RGX. C	Arg79	14.33
40	D	3FXI. B	Asn235	1RGX. C	Arg41	0.00
41	D	3FXI. B	Glu266	1RGX. C	Arg41	-1.10
42	D	3FXI. B	Gly267	1RGX. C	Arg41	4.74

D	H	I
Distancia	H-Unión	Iónico

## **X.2. Resistina promueve el incremento en la migración de células de la línea celular prostática PC3.**

Resistina ha presentado la característica de interactuar con TLR4, y presentada un papel asociado a enfermedades inflamatorias e infecciosas, metabólicas y en cáncer [108-110]. Por lo cual, decidimos evaluar el efecto de la resistina sobre el proceso de migración en células PC3 mediante la técnica de cierre de herida. Para cumplir este objetivo nuestro grupo de trabajo sostuvo cultivos confluentes de células de la línea PC3, una vez que se alcanzó la confluencia deseada de 100% proseguimos a realizar las heridas para posteriormente, estimular los cultivos ayunados y previamente tratados con mitomicina C con diferentes concentraciones de resistina (0-100 ng/mL), además de un estímulo con suero fetal bovino como control positivo en conjunto, esto durante 48 horas. Como se puede observar en la figura 12A, la resistina favorece el incremento en el proceso de migración de las células PC3, contemplando un máximo efecto en la concentración de 25 ng/mL de resistina en un lapso de 48 horas de estímulo. Debido a los resultados obtenidos fue que decidimos utilizar dicha condición para todos los experimentos posteriores. En la figura 12B se puede observar el análisis estadístico de al menos 3 experimentos independientes, en los que corroboramos que existe una diferencia significativa entre los experimentos realizados en comparación con el grupo control.

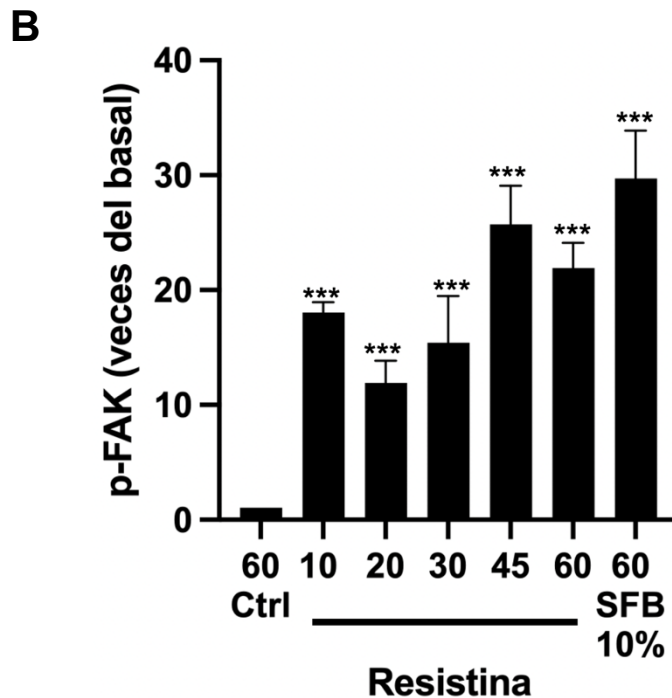
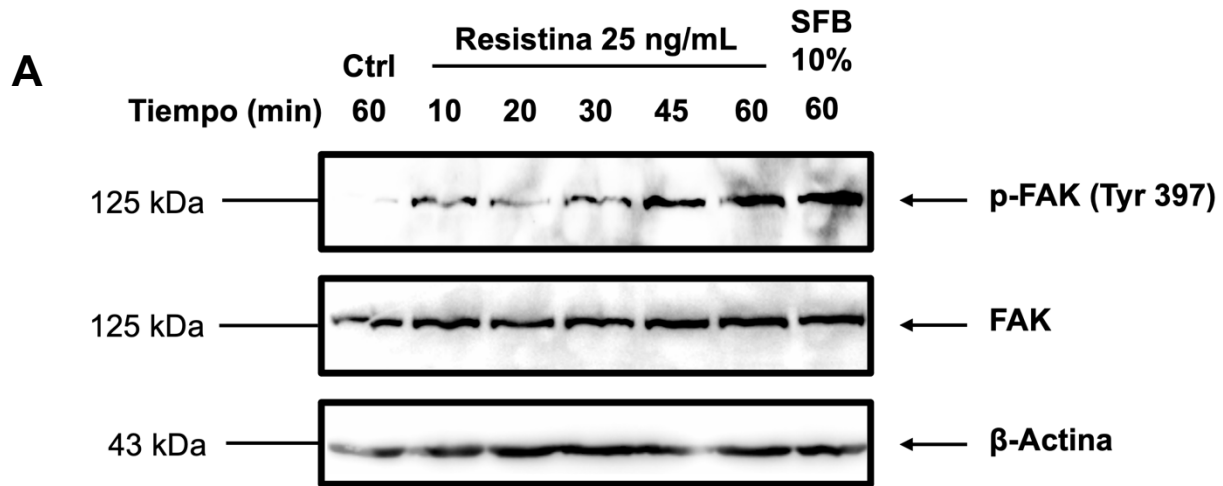


**Figura 13. La resistina induce la migración en células de cáncer de próstata.**

Panel A. La migración celular se evaluó mediante un ensayo de herida. Las células se trataron con diferentes concentraciones de resistina y se analizó la migración de las células después de 48 horas de estímulo. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD y se expresan como veces del basal de migración por encima del control. Panel B. Los asteriscos indican las comparaciones realizadas con el control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , evaluado mediante una ANOVA de una vía.

### **X.3. La resistina incrementa los niveles de fosforilación de la cinasa de adhesión focal FAK en la línea celular prostática PC3.**

La fosforilación de FAK se asocia a un aumento de los proceso de migración e invasión [111-117]. Por lo cual, determinamos el efecto del tratamiento con resistina sobre la fosforilación de FAK en la línea celular prostática PC3. Para ello, obtuvimos los extractos de proteínas totales de células PC3 de cultivos confluentes, los cuales fueron estimulados en ausencia y presencia de resistina a una concentración de 25 ng/mL en los de 10, 20, 30, 45 y 60 min. Mediante la técnica de western blot se midieron los niveles de proteínas utilizando anticuerpos anti-p-FAK (Tyr-397), anti-FAK y los niveles de  $\beta$ actina se utilizaron como control de carga. Nuestros resultados demuestran que el estímulo de resistina induce un incremento en el nivel de fosforilación de FAK (p-FAK-Tyr<sup>397</sup>) dependiente del tiempo de tratamiento (Fig 13A). El análisis densitométrico y estadístico de al menos tres experimentos independientes determinó que el nivel de fosforilación de la cinasa FAK incrementó hasta treinta veces respecto al grupo que no recibió dicho estímulo (Fig 13B).

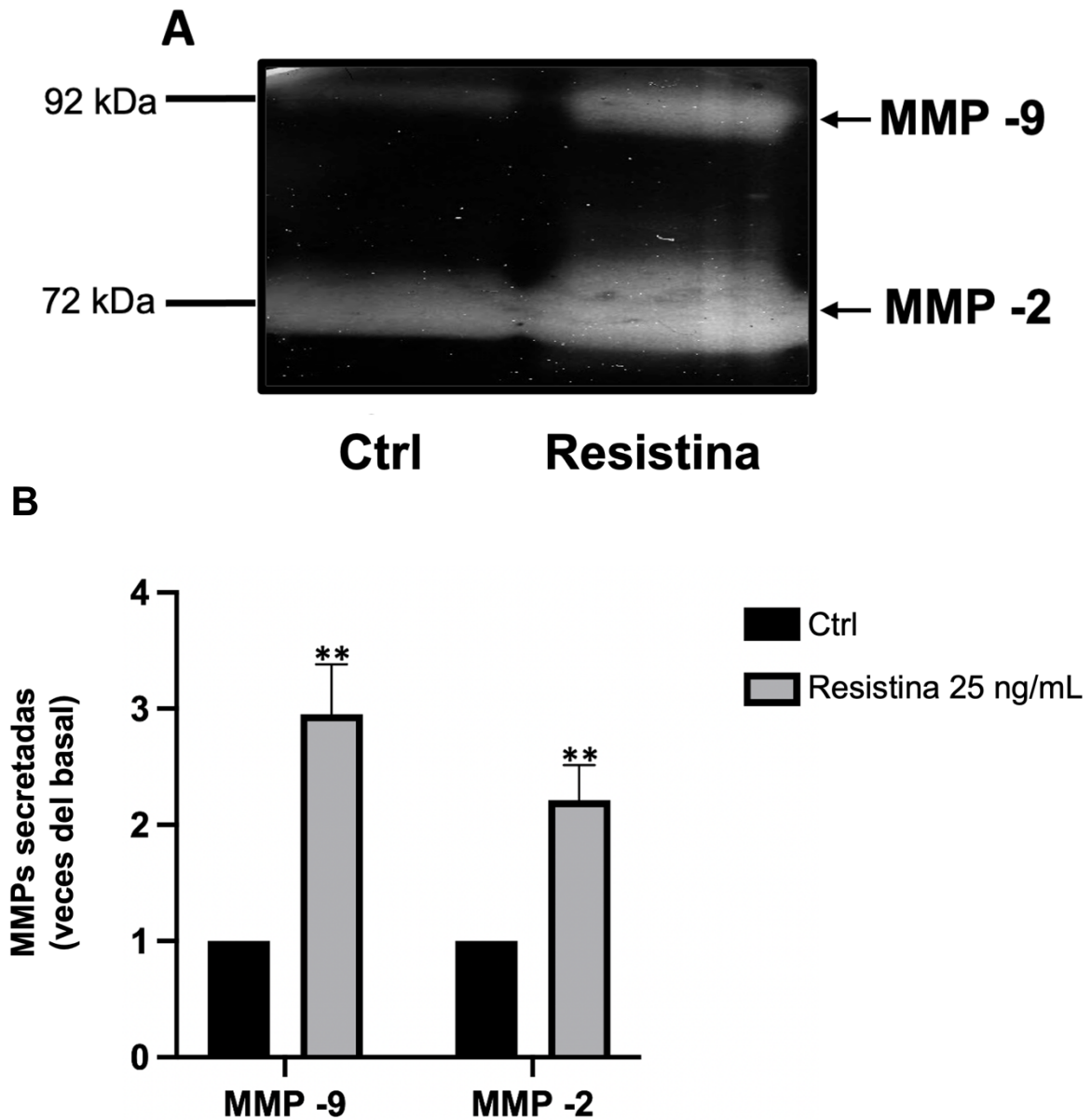


**Figura 14. La resistina induce el incremento en los niveles de fosforilación de la cinasa FAK en células de cáncer de próstata.**

Panel A. Los lisados celulares de células PC3 tratadas con o sin resistina se analizaron con la técnica de Western blot para evaluar los niveles de p-FAK y FAK, así como la actina como control de carga. Panel B. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD y se expresan como el pliegue de migración por encima del valor de control. Los asteriscos indican las comparaciones realizadas con el control. \*\*\*P < 0.001, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

#### **X.4. La resistina promueve un incremento de los niveles de secreción de la MMP -2 y MMP -9 en la línea celular tumoral prostática PC3.**

En la familia de las metaloproteinasas existen cinco clasificaciones, las matrilisinas (MMP -7, MMP -12, MMP-20 y MMP -26) pueden degradar laminina, lanectina y colágeno, las colagenasas intersticiales (MMP -1, MMP -8, MMP -13 y MMP -18) son las encargadas de separar los tipos de colágeno fibrilar I, II y III; estromalisinas (MMP -3, MMP -10 y MMP -11) interactúan con múltiples componentes de la matriz extracelular, incluidos laminina, fibronectina y colágeno amorfo, las MMP asociadas a membrana (MMP -14, MMP -15, MMP -16, MMP -17, MMP -24 y MMP -25) son asociadas a la membrana celular; y las gelatinasas (MMP -2 y MMP -9) que tienen la particularidad de degradar fibronectina y colágeno tipo IV [118]. En particular, la evidencia ha demostrado que en procesos cancerígenos existe una gran correlación entre los niveles secretados de las gelatinasas -2 y -9 en los procesos de invasión celular y metástasis [119]. Con base en ello, decidimos evaluar el impacto del estímulo con resistina en la secreción de las MMP -2 y MMP -9 en células PC3 mediante la técnica de zimografía. Cultivos confluentes de células PC3 fueron estimuladas con la concentración de 25 ng/mL de resistina durante 48 horas. Posteriormente, se obtuvo el medio sobrenadante para ser concentrado y analizado mediante el ensayo de zimografía. Los resultados obtenidos demuestran que la resistina incrementa la secreción de las MMP -2 y -9 a la concentración de 25 ng/mL (Fig 14A). En la figura 14B se puede observar el análisis estadístico de al menos tres experimentos independientes, donde se muestra un incremento de la secreción de las MMP -2 y -9, dicho incremento fue de dos a tres veces comparado con el grupo control.

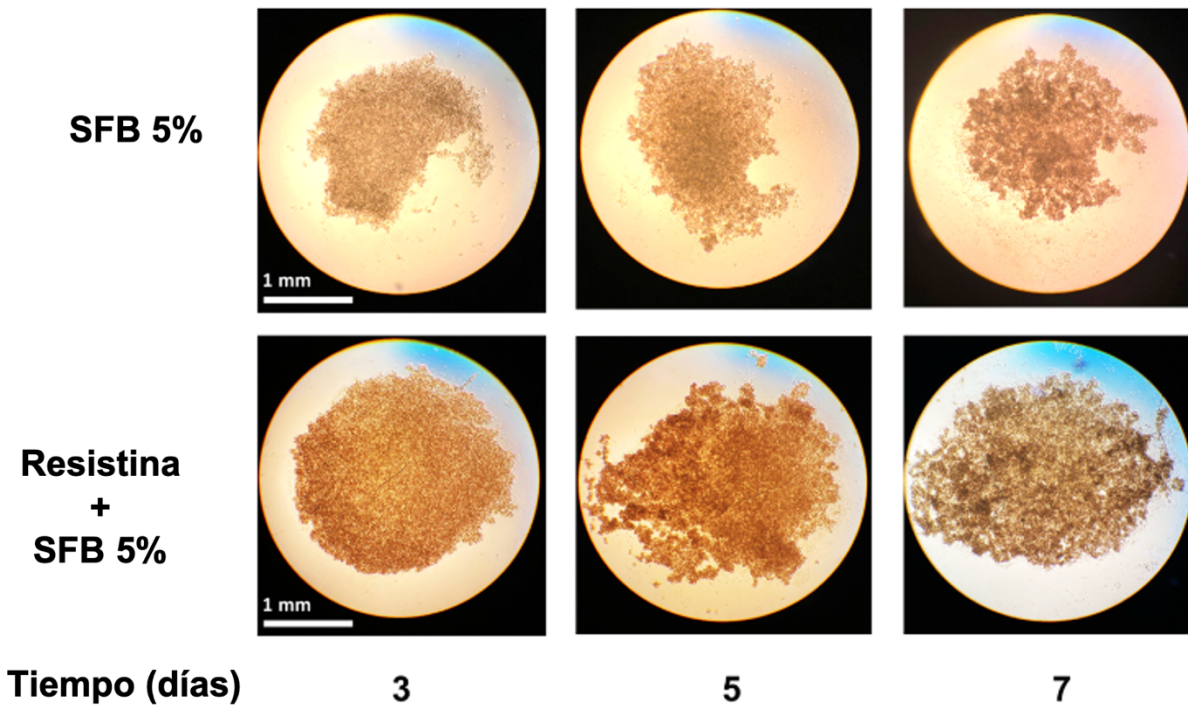
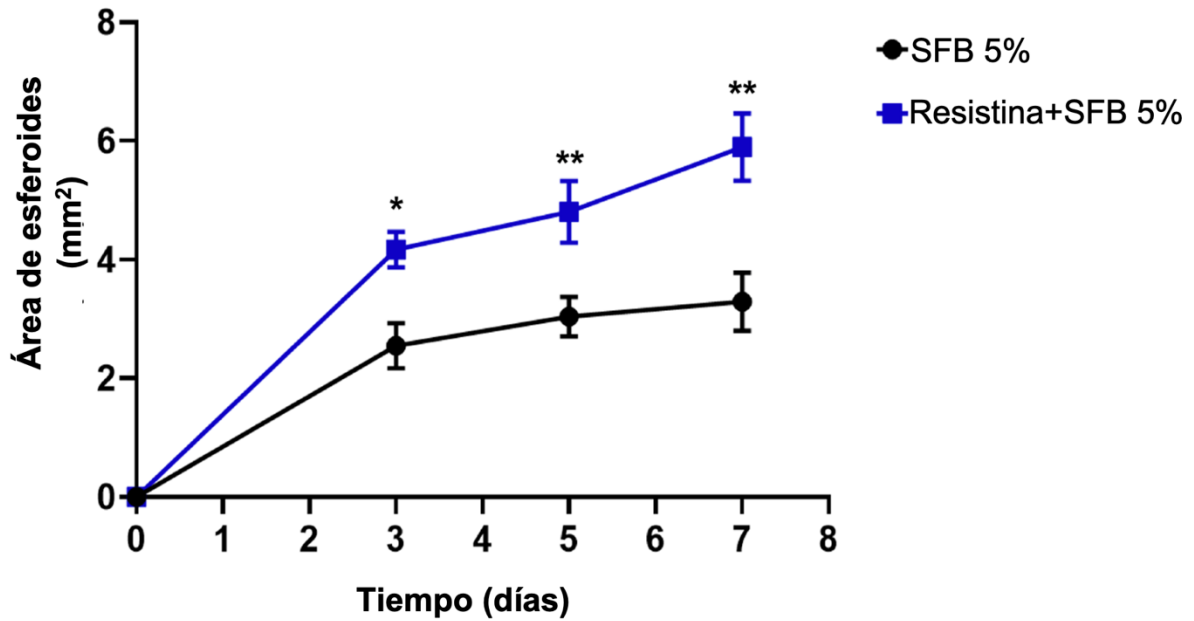


**Figura 15. La resistina aumenta la secreción de MMP -2 y MMP -9 en células PC3.**

Panel A. Las células PC3 se trataron durante 48 h con resistina, momento en el que se obtuvo el medio acondicionado y se procesó mediante zimografía para evaluar la secreción de MMP-2 y MMP-9. Panel B. El gráfico representa la media  $\pm$  SD y se expresa como el pliegue de invasión por encima del valor de control. \*\* $P < 0.01$ , evaluado mediante una ANOVA de una vía.

### **X.5. La resistina induce un aumento en el crecimiento de esferoides de cultivo 3D en células tumorales PC3.**

Nuestros datos anteriores muestran que los cultivos que reciben el tratamiento con resistina incrementan los procesos de migración e invasión celular correspondientes. Por lo tanto, decidimos examinar el papel de la resistina en la formación de esferoides (cultivos 3D) en células tumorales prostáticas. Para ello, células PC3 se sembraron en placas de 24 pozos recubiertas con un 1,5 % de agarosa. Las células PC3 ( $1 \times 10^5$  células) se trataron con SFB al 5% o resistina (25 ng/mL) con 5% de SFB durante 7 días. Finalmente, se tomó evidencia fotográfica en los días 3, 5 y 7 como se muestra en la Figura 15. Nuestros datos indican que el tratamiento conjunto de resistina y SFB induce un crecimiento significativo en el crecimiento de los esferoides, duplicando el área del esferoide al día 7 de tratamiento con respecto a la condición donde solo recibieron la suplementación de 5% de SFB solamente (Fig 15 A). En la figura 15B, se puede observar el análisis estadístico de al menos tres experimentos independientes, donde se muestra un incremento en el crecimiento de los esferoides, dicho incremento fue de tres a seis veces comparado con el grupo control.

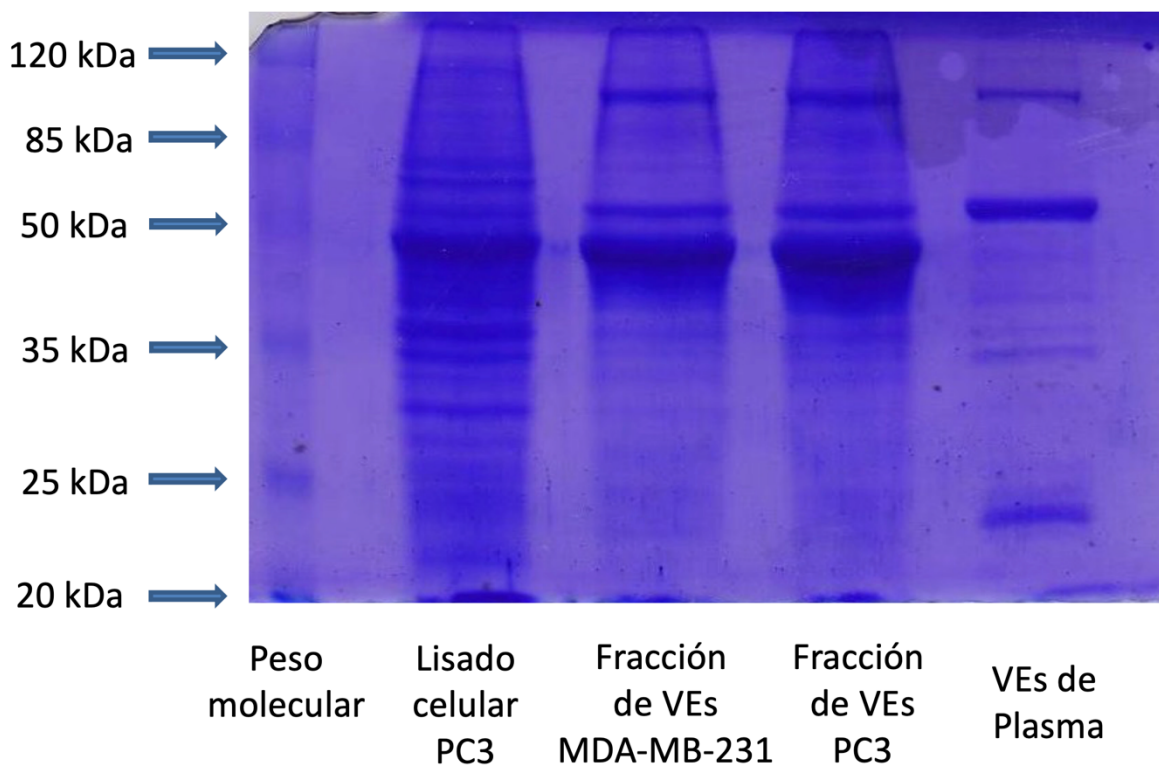
**A****B**

**Figura 16. La resistina promueve un incremento en los esferoides de células PC3.**

Panel A. Las placas de 24 pozos fueron recubiertas con 400  $\mu$ L de agarosa al 1,5 %. Posteriormente, se colocaron alrededor de  $1 \times 10^5$  de células PC3 por condición, las cuales se trataron con un 5% de SFB solo o con un 5% de SFB + resistina (25 ng/mL) durante siete días. Durante el ensayo, el seguimiento se mantuvo foto documentado durante los días 3, 5 y 7. Finalmente, el área esferoidal se analizó con el software ImageJ. Panel B. El gráfico representa la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes y se expresa como área del esferoide (mm<sup>2</sup>). La barra de escala es igual a 1 mm. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ , los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t Student.

### X.6. Estandarización de la técnica de ultracentrifugación diferencial.

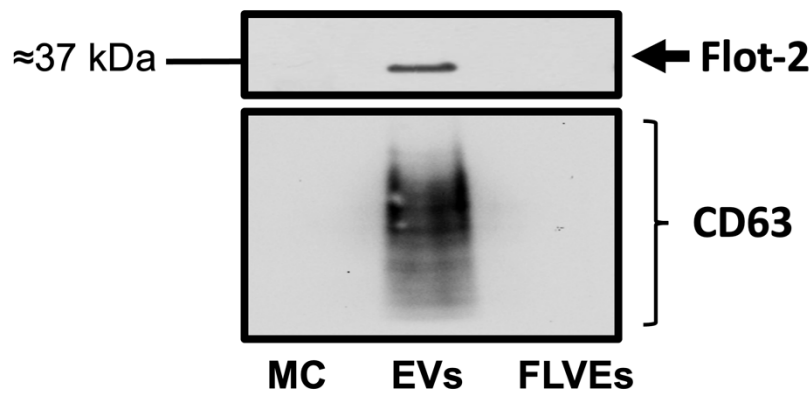
Si bien se ha demostrado la participación de resistina en algunos procesos tumorales [120,121], no existen reportes hasta el momento del papel de resistina en la secreción de VEs. Para evaluar este evento, en primera instancia se estandarizó el aislamiento de VEs mediante centrifugación diferencial (Fig 16). Como se observa en la figura 17, el perfil de proteínas de la fracción enriquecida con VEs de células tumorales MDA-MB-231 y PC3 presentan diferencias con respecto a los lisados celulares totales de células PC3.



**Figura 17. Estandarización de la técnica Ultra-centrifugación diferencial.**

Se realizó un SDS-PAGE y posterior tinción con azul de comassie para analizar las muestras procesadas mediante la técnica de ultracentrifugación para comparar la carga proteica con un lisado total celular. Las fracciones enriquecidas con vesículas extracelulares de células MDA-MB-231 y PC3 muestran una diferencia en la expresión proteica en comparación con el lisado celular total.

Para confirmar la presencia de VEs en la fracción enriquecida obtenida, se evaluó la expresión de Flot-2 y de CD63, puesto que se ha demostrado que son proteínas ampliamente utilizadas como marcadores de VEs [122,123]. Nuestros datos indican que en la fracción enriquecida con VEs existe una fuerte expresión de los marcadores flot-2 y CD63, mientras que la proteína fue indetectable en el medio condicionado sin procesar y en la fracción libre de VEs (Fig. 18).



MC: Medio condicionado.

VEs: Fracción enriquecida en VEs

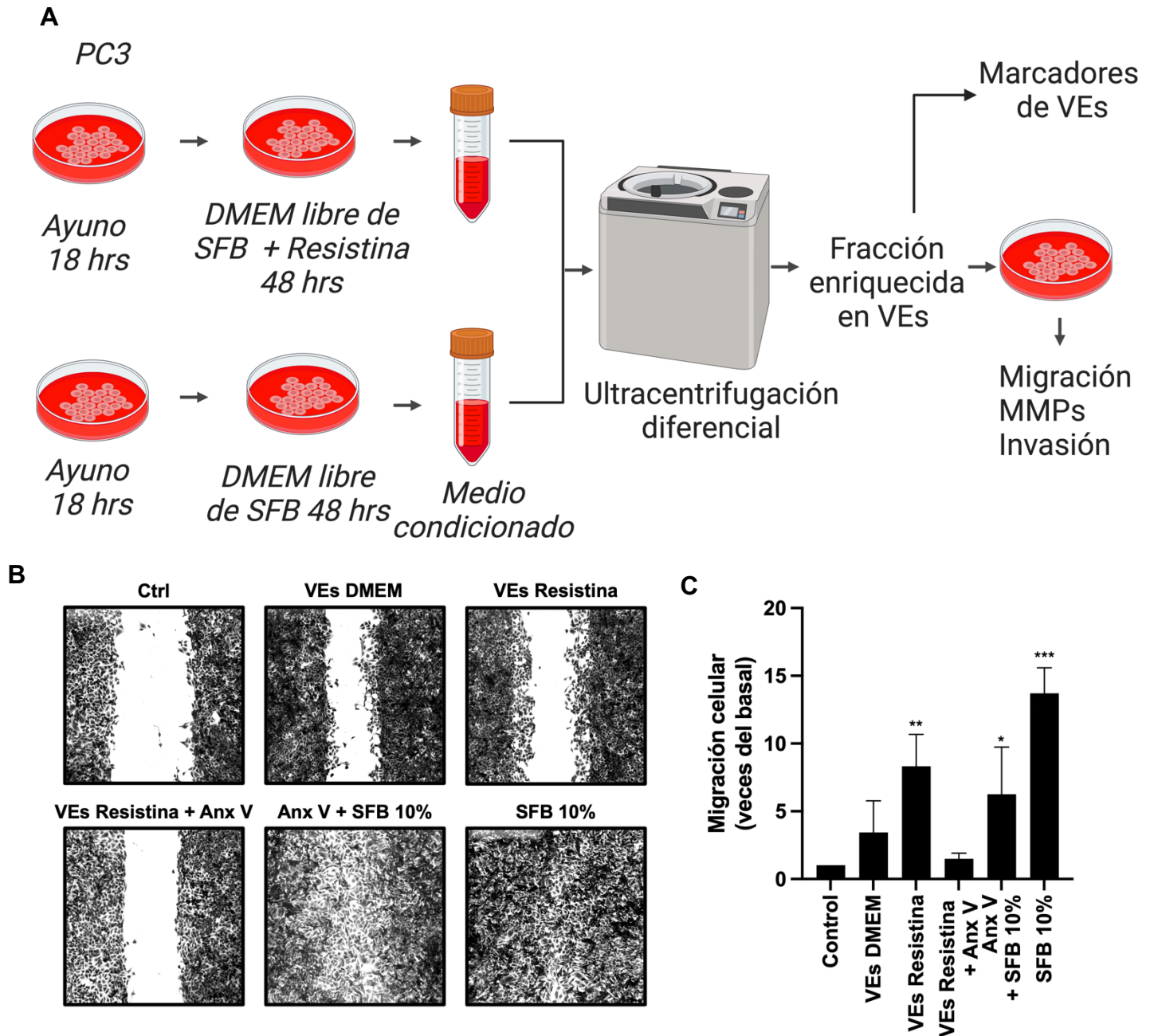
FLVEs: Fracción libre de VEs

**Figura 18. Expresión de flotilina 2 y CD63 en muestra ultra-centrifugada.**

El resultado mostró la expresión de flotilina 2 y CD63 en la fracción enriquecida de vesículas extracelulares, por otro lado, en el medio condicionado y la fracción libre de VEs se encuentra libre de dicha expresión.

### **X.7. Resistina induce la secreción de VEs que promueven la migración celular en células prostáticas PC3.**

Nuestros resultados previos demuestran que la técnica estandarizada de ultracentrifugación diferencial permite obtener una fracción enriquecida de VEs. Evidencia reciente demuestra la participación de VEs en la progresión de diferentes tipos de cáncer [96,97,124], específicamente en el proceso de metástasis [98,125]. Esto debido al contenido que llevan, el cual consiste en RNA, ncRNA, miRNA y contenido proteico entre otros [126]. Sin embargo, el papel de las VEs de línea celular cancerígena PC3 bajo tratamiento de resistina no ha sido descrito. Por ello, con la finalidad de evaluar el posible papel de las VEs obtenidas de medios condicionados, las células PC3 fueron estimuladas con resistina, desarrollamos la siguiente estrategia experimental: células PC3 previamente ayunadas fueron estimuladas con o sin resistina durante 48 h, tiempo en el que se obtuvieron los medios condicionados y se procesaron mediante la técnica de ultracentrifugación diferencial para obtener la fracción enriquecida de VEs (Fig 19A). Una vez obtenida la fracción enriquecida de VEs, fueron utilizadas para determinar su papel en el proceso de migración celular. Como se pueden observar las VEs obtenidas de células tratadas con y sin resistina incrementan la capacidad migratoria de las células PC3, además, se puede observar como las que recibieron el estímulo de VEs provenientes del tratamiento de resistina en células PC3, la diferencia es mayor en comparación con las VEs secretadas por células sin tratamiento y que el grupo que no recibió estímulo vesicular. La anexina V fue utilizada como un control inhibitor de la captación de las VEs, esto como respaldo sobre el efecto las VEs sobre el proceso de migración celular (Fig 19B). En la figura 19C se puede observar el análisis estadístico de al menos tres experimentos independientes, en los que se corrobora la diferencia significativa de los experimentos realizados con tratamiento de VEs provenientes de células estimuladas con resistina en comparación con el grupo control.



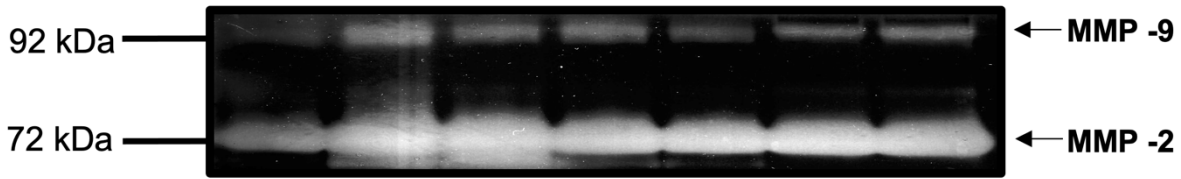
**Figura 19. Las vesículas extracelulares derivadas de células PC3 tratadas con resistina inducen la migración celular en células PC3.**

Panel A. Se utilizó ultracentrifugación diferencial para aislar una fracción enriquecida de VEs. Panel B. La migración celular se evaluó mediante un ensayo de herida por ralladura, las células se trataron con vesículas extracelulares derivados de células PC3 tratadas con o sin resistina (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por condición). Panel C. Después de 48 h se analizó la migración de las células. Las gráficas representan la media  $\pm$  D.E. Independientes y son expresados como las veces de migración con respecto al control. Los asteriscos denotan significancia estadística. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , evaluado mediante una ANOVA de una vía.

#### **X.8. Las VEs de cultivos PC3 tratados en presencia de resistina incrementan los niveles de secreción de la MMP -2 y MMP -9.**

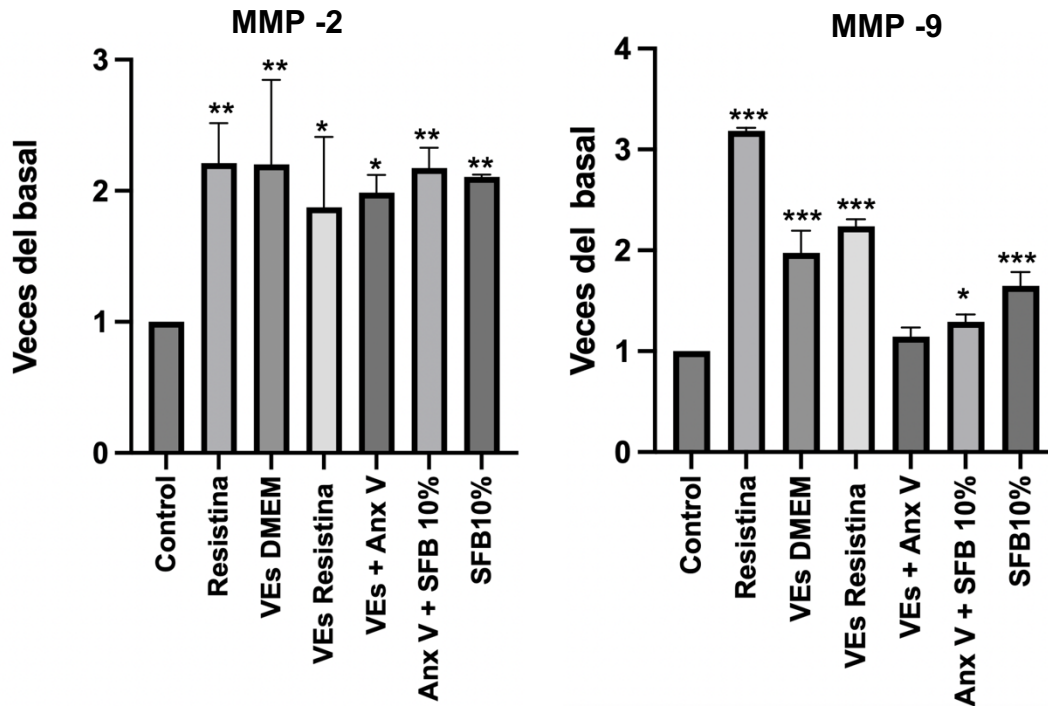
Con base en nuestros resultados, donde demostramos que la fracción enriquecida con VEs derivadas del tratamiento con resistina se asocian al proceso de migración. Decidimos evaluar si el tratamiento con las VEs se asocia al proceso de secreción de las MMP -2 y MMP -9 mediante la técnica de zimografía. Nuestros datos obtenidos indican que las VEs derivadas de la ausencia del estímulo con resistina en células PC3 inducen un incremento en la secreción de MMP -2 y MMP -9, en comparación con las células ausentes de tratamiento con VEs (Fig 20A). De la misma manera, asociado con los resultados previos en la evaluación del proceso de migración, las células PC3 que recibieron el estímulo de VEs derivadas de tratamiento con resistina, incrementaron el nivel de la secreción de las MMP -2 y MMP -9 en los medios condicionados. Nuestros resultados demuestran la relación del tratamiento con VEs de células PC3 estimuladas con resistina y el proceso de invasión celular. Adicionalmente, utilizamos una condición con pre-tratamiento de las VEs en conjunto con Anexina V, un inhibidor de la captura de VEs, logrando observar una disminución en la secreción de MMP-2 con niveles similares al control (Fig 20A). En la figura 20B podemos observar el análisis estadístico de al menos tres experimentos independientes, donde corroboramos diferencia significativa en los niveles de secreción de la MMP -2 y MMP -9 al ser estimulados con VEs obtenidas de los medios condicionados de células PC3 tratadas con resistina.

A



DMEM	+	+	+	+	+	+	+
Resistina	-	+	-	-	-	-	-
VEs DMEM	-	-	+	-	-	-	-
VEs Resistina	-	-	-	+	+	-	-
Anx V	-	-	-	-	+	+	-
SFB 10%	-	-	-	-	-	+	+

B

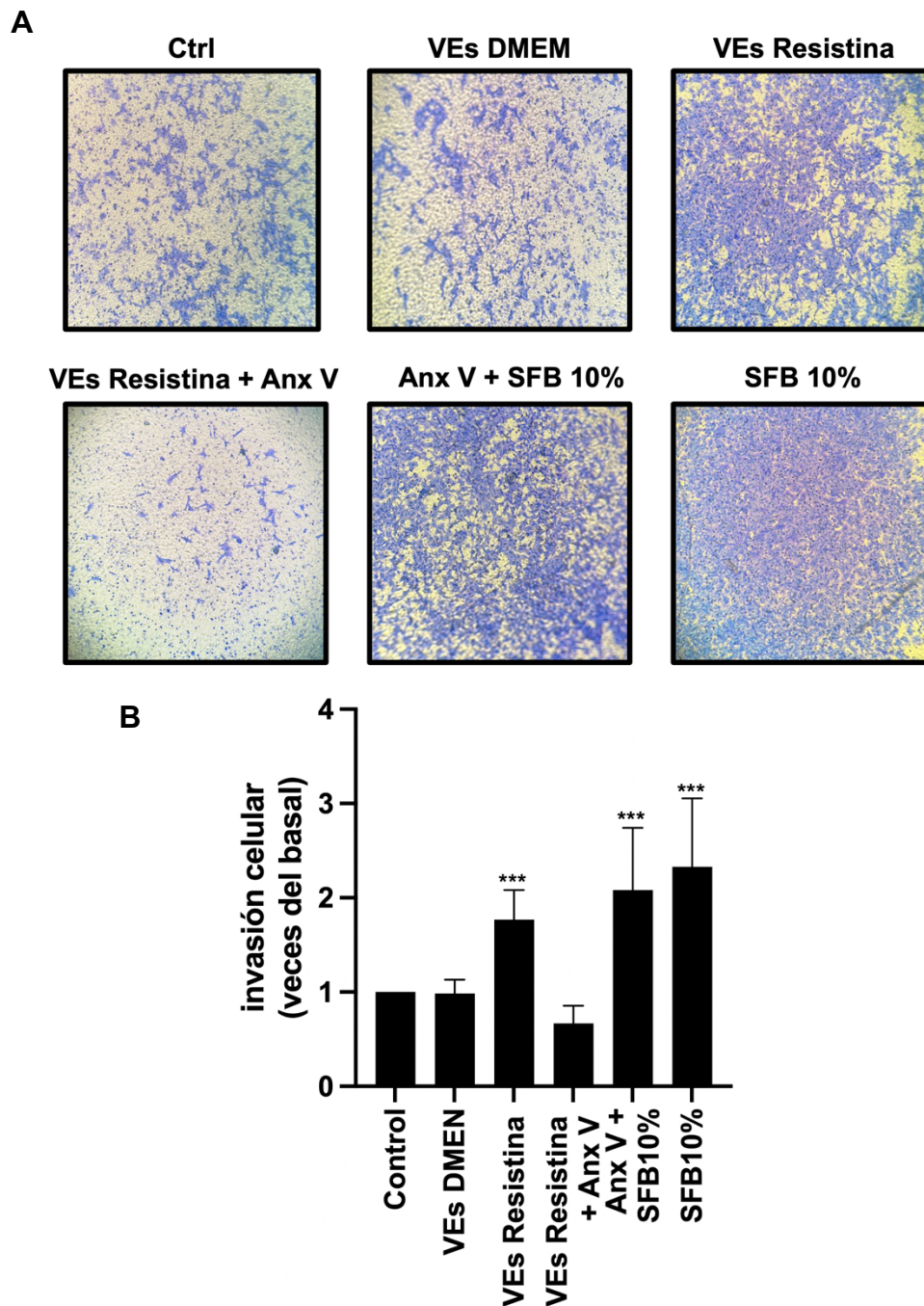


**Figura 20. Las vesículas extracelulares derivadas de células PC3 tratadas con resistina inducen la invasión celular en PC3 de forma autocrina.**

Panel A. Las células PC3 se trataron durante 48 h con EV derivados de células PC3 tratadas con resistina o sin tratamiento con resistina, los sobrenadantes se recolectaron y analizaron mediante zimografía para evaluar la secreción de MMP-2 y MMP-9. Panel B. El gráfico representa la media  $\pm$  SD y se expresa como las veces del basal sobre el proceso de secreción de las MMP -2 y MMP -9 por encima del valor del grupo control. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

### **X.9. VEs derivadas del tratamiento con resistina inducen invasión en células PC3.**

Puesto que en conjunto nuestros datos indican que el tratamiento con resistina induce el proceso de migración celular juntamente con un incremento en la secreción de las MMP -2 y MMP -9, así como el estímulo de VEs obtenidas de los sobrenadantes de cultivos celulares PC3 que recibieron el tratamiento con resistina incrementan procesos asociados con la agresividad tumoral. Nuestro equipo de trabajo decidió determinar el efecto de la fracción enriquecida de VEs sobre el proceso de invasión celular en la línea prostáticas PC3. Como se observa en la figura 21A, el tratamiento con resistina incrementa la capacidad de invasión, sumado a esto, los cultivos celulares que fueron estimulados con VEs obtenidas de sobrenadantes de células PC3 tratados con resistina incrementaron la capacidad invasiva comparada con el grupo control. Adicionalmente, el pre-tratamiento de la fracción enriquecida de VEs con anexina V, inhibe la invasión de células PC3 indicando que el efecto es derivado de la captura de VEs (Fig 21A). En la Figura 21B, se puede apreciar el análisis estadístico de al menos tres experimentos independientes, donde se demuestra la diferencia significativa entre el cultivo que recibió el tratamiento con VEs recuperadas de medios condicionados de células PC3 bajo el tratamiento de resistina comparado con el grupo que no recibió el tratamiento.

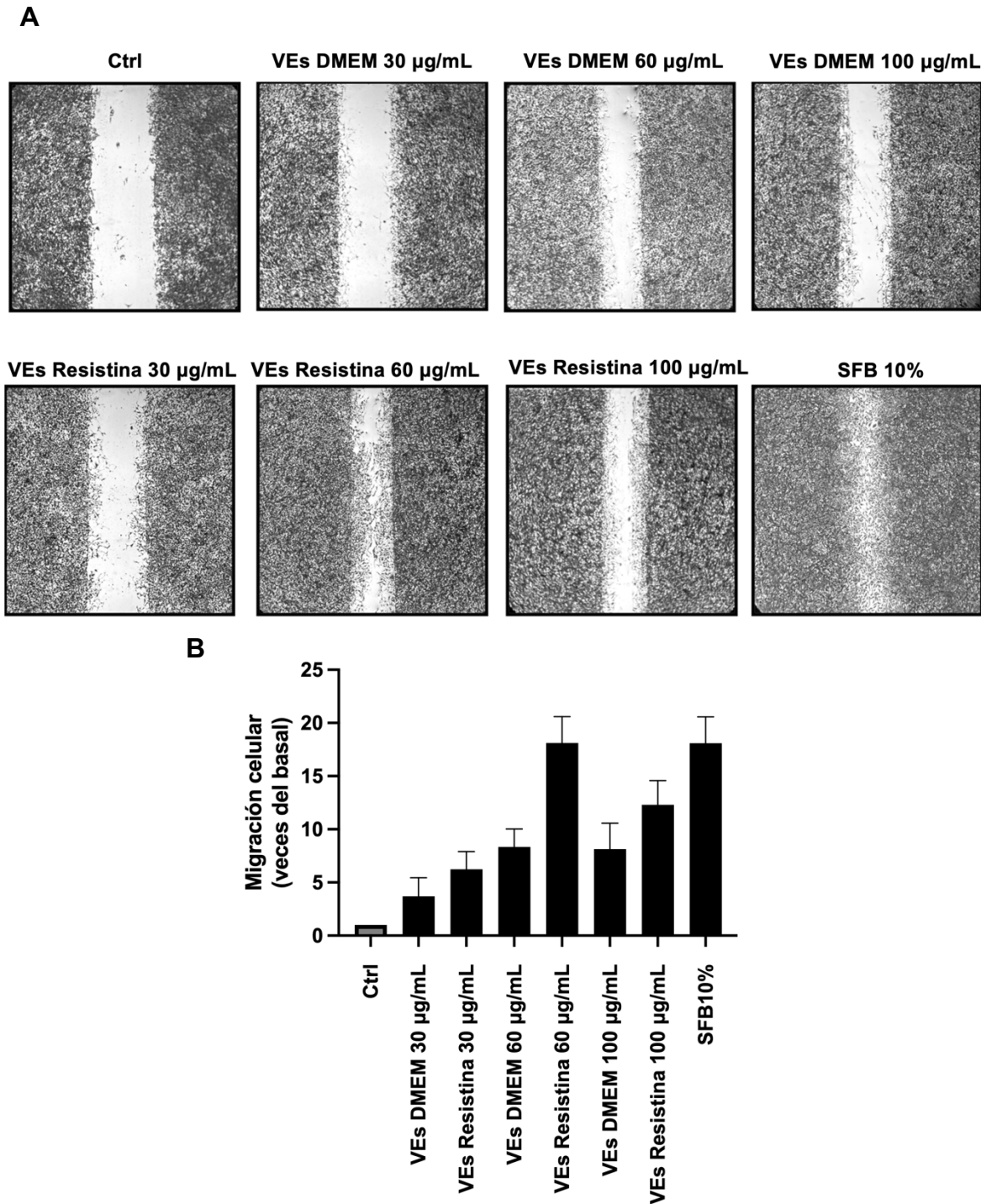


**Figura 21. Vesículas extracelulares derivadas de células PC3 tratadas con resistina inducen la invasión celular en PC3 de forma autocrina.**

Panel A. Se usó el método de la cámara de Boyden para evaluar la invasión de células PC3 cuando se estimularon con EV derivados de células PC3 tratadas con resistina o sin tratamiento con resistina, las células se sembraron en la cámara superior recubierta previamente con matrigel y se agregó el tratamiento con EV a la cámara inferior, después de 48 h se analizó la invasión celular. Panel B. El gráfico representa la media  $\pm$  SD y se expresa como el pliegue de invasión por encima del valor de control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , evaluado mediante una ANOVA de una vía.

#### **X.10. Efecto de las VEs provenientes de estímulos de resistina en células PC3.**

Una vez que nuestros resultados determinaron que el estímulo de VEs recuperadas de los sobrenadantes de cultivos tratados con resistina incrementa los procesos involucrados en la progresión tumoral, decidimos evaluar el efecto de las VEs en la migración a diferentes concentraciones (30, 60 y 100  $\mu\text{l}/\text{mL}$ ). Nuestros resultados proponen, que el estímulo de VEs a la concentración de 60  $\mu\text{l}/\text{mL}$  favorece el proceso de migración comprado con los demás tratamientos, además, se corrobora con nuestros resultados previos donde demostramos que el estímulo de VEs recuperadas de medios condicionados con resistina favorece el proceso de migración al ser comparado con el grupo que no recibió dicho tratamiento (Fig 22A). La gráfica obtenida del análisis estadístico de dos experimentos independientes sugieren el incremento del proceso de migración cuando las células son estimuladas con VEs recuperadas de medios condicionados donde las células fueron tratadas con resistina, observándose el mayor efecto a la concentración de 60  $\mu\text{l}/\text{mL}$  transcurridas las 48 horas del experimento (Fig 22B).

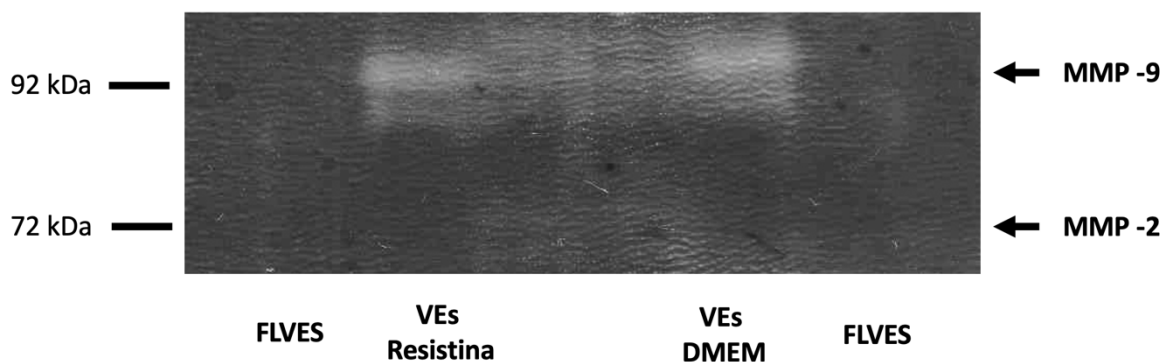


**Figura 22. Las VEs regulan la migración en células PC3 dependiente de la concentración.**

Panel A. Se realizó una ralladura a cultivos celulares PC3 confluentes. Posteriormente, se prosiguió con estímulos de 48 horas en presencia de VEs recuperadas de medios condicionados tratados en presencia o ausencia de resistina. Panel B. Las gráficas representan la media  $\pm$ D.E. de dos experimentos independientes y son expresados como veces del basal con respecto al control. Las fotografías fueron tomadas 48 horas después de recibir los diversos estímulos.

### **X.11. Las VEs transportan moléculas cargo involucradas en la progresión tumoral.**

En resultados previos demostramos que tanto el tratamiento con resistina como las VEs derivadas del estímulo de resistina en células PC3 incrementan los procesos de migración e invasión celular, por lo cual, decidimos analizar el contenido de las VEs con la finalidad de evaluar la presencia de las MMP -2 y MMP -9, esto derivado de nuestra investigación donde asociamos la secreción de dichas gelatinasas con el incremento de la progresión tumoral. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de la MMP -9 en las VEs analizadas de sobrenadantes provenientes de cultivos tratados en ausencia y presencia de resistina (Fig 23). Este resultado sustenta el impacto que tienen las VEs en la invasión celular, lo cual puede impactar en la progresión tumoral.



**Figura 23. Las VEs presentan moléculas cargo asociadas a la progresión tumoral en células PC3 estimuladas en presencia o ausencia de resistina.**

Cultivos confluentes de células PS3 fueron tratados en presencia o en ausencia de resistencia durante 48 horas. A continuación, se obtuvieron cultivos confluentes de células PS3 fueron tratados en presencia o en ausencia de resistencia durante 48 horas. A continuación, se obtuvieron los medios condicionados para ser procesados mediante ultracentrifugación diferencial, obteniendo finalmente una fracción enriquecida con vesículas extracelulares de los medios condicionados para ser procesados mediante ultracentrifugación diferencial, obteniendo finalmente una fracción enriquecida con VEs, las cuales fueron procesadas mediante la técnica de zimografía. El resultado sugiere la presencia de la metaloproteinasas nueve en las VEs obtenidas.

## **XI. Discusión**

La resistina es una adipocina implicada en procesos metabólicos e inflamatorios. En la actualidad, existen estudios donde han indicado una relación entre los niveles elevados de resistina circulante con el sobrepeso y la obesidad. Estas condiciones están asociadas con múltiples enfermedades, por ejemplo, el desarrollo de la diabetes mellitus, hipertensión, dislipidemia, síndrome metabólico y el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer [127,128].

Existe evidencia de que la resistina aumenta la agresividad en el cáncer de mama, favoreciendo procesos como el crecimiento tumoral al aumentar la actividad de BCL-2 y BCL-xL, acompañados por una disminución en las caspasas -7 y -3. Curiosamente, la resistina promueve la metástasis en el cáncer de mama al aumentar la actividad de Src e inducir la translocación al núcleo de PKC $\alpha$  [129]. La resistina se ha relacionado con la progresión tumoral en pacientes con cáncer de próstata. Un estudio en el que participaron pacientes coreanos demostró que a medida que aumentaba la escala de Gleason, había un aumento en la expresión de resistina en tejido tumoral de próstata. Esto fue acompañado por un aumento en la proliferación y fosforilación de Akt en las líneas celulares de cáncer prostático PC3 y DU-145 [86]. Por otro lado, TLR4 se ha visto involucrado en el incremento de los procesos de migración e invasión celular en cáncer de pulmón y en la inducción del fenotipo mesenquimal en cáncer mamario. Por su parte, CAP1 ha sido vinculado con el incremento migratorio de células de cáncer de mama. A pesar de dicha evidencia, la interacción de resistina con los receptores TLR4 y CAP1 no ha quedado elucidado por completo en cáncer prostático, por ello, es importante predecir el comportamiento celular bajo dicho estímulo y analizar el efecto de la señalización celular en los procesos cancerígenos. Por lo tanto, decidimos evaluar si la resistina interactúa con los receptores CAP1 y TLR4 mediante la técnica de docking molecular, además, de estudiar el impacto en procesos celulares asociados con la progresión tumoral en el cáncer de próstata. No obstante, de acuerdo con la evidencia existente, deducimos que los efectos biológicos asociados con el incremento de invasión celular son mediante TLR4, sin embargo, es necesario se

realicen las investigaciones correspondientes para determinar dicho fenómeno. En este trabajo, mostramos mediante un ensayo *in silico* que la resistina puede interactuar con los receptores CAP1 y TLR4, además de inducir un aumento en los procesos de migración e invasión en la línea celular PC3, concomitante con un aumento en la secreción de MMP-2 y MMP-9 y el incremento en los niveles de fosforilación de FAK (Tyr-397) [86,128]. La organización estructural de CAP1 cuenta con tres dominios principales, la región N-terminal, la región media (MD) rica en prolina, y la región C-terminal, de las cuales la región N-terminal es capaz de mediar señalización mediante la vía RAS/AMPC y la región C-terminal está relacionada con la regulación del citoesqueleto de actina [130]. Sudan et. al, describe las vías de señalización moduladas por la interacción de CAP1 y resistina, donde la activación de CAP1 aumentó la expresión y secreción de citocinas pro-inflamatorias inducidas por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, además de modular las vías STAT's, ERK/c-Myc y PI3K/Akt/SP-1 asociadas a los procesos de migración e invasión celular [131]. Nuestros resultados *in silico* demuestran la interacción de resistina en tres posiciones distintas con el receptor CAP1 en al menos 42 sitios de unión en C-terminal. Por otro lado, TLR4 se ha encontrado a niveles elevados en cáncer mamario favoreciendo los procesos de metástasis y proliferación [132,133], existe evidencia que la activación de TLR4 modula vías de señalización río abajo como Src, PI3K/Akt/mTOR, y MAPK, asociadas con la progresión tumoral [131], incluso, niveles elevados de TLR4 y MyD88 presentes en pacientes con cáncer colorrectal fue asociada a una baja supervivencia [134]. Nuestros resultados *in silico* demuestran la interacción de resistina en las tres posiciones más eficiente con el receptor TLR4 en al menos 38 sitios de unión en la región extracelular. Además, de la interacción altamente probable entre del receptor CAP1 con resistina, donde el E-score con mayor afinidad se presentó en la interacción de CAP1 vs resistina (-77.7155 kcal/mol) seguido por la interacción de TLR4 vs resistina (-62.7696 kcal/mol), estos resultados nos señalan que existe una alta posibilidad de interacción, sin embargo, los procesos celulares observados en este estudio podrían ser derivados de la interacción de resistina con TLR4, esto debido a los efectos que regula la activación de TLR4 en otros modelos cancerígenos.

Niveles elevados en la fosforilación de FAK se asocia con una mayor agresividad tumoral en procesos como migración, invasión y metástasis [117,135,136]. Además, se ha demostrado que la fosforilación de FAK en su residuo Tyr-397 está relacionada con su máxima actividad catalítica, activando proteínas como PI3K, Src, Grb7 y N-WASP [112,116]. Dando como resultado una elevada capacidad migratoria e invasiva en células cancerosas [112]. Nuestros resultados demuestran el incremento de actividad de la cinasa FAK en su residuo Tyr-397 cuando células cancerosas de la línea PC3 son estimuladas con resistina, proceso que se encuentra altamente asociado con el aumento de la migración y el proceso de la invasión celular. Adicionalmente, la secreción de MMP-2 y MMP-9 por las células cancerosas es un mecanismo importante del proceso de invasión celular ya que estas enzimas son capaces de degradar componentes de la membrana basal como colágeno tipo IV, un proceso asociado con tumores altamente invasivos y metastásicos [137]. La secreción de las MMPs puede ser inducida por la activación de la vía PI3K/Akt, que conduce a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. El factor de transcripción NF $\kappa$ B regula la expresión de múltiples proteínas que modulan la invasión celular, entre las que son Snail1 y 2, Twist1 y 2, vimentina, MMP-9 y MT1-MMP, que induce la activación de MMP-2 [137]. En este trabajo se confirmó que el tratamiento con resistina a concentraciones fisiológicamente alcanzables (25 ng/mL) tiene efecto en las células PC3 aumentando el nivel de secreción de MMP-2 y MMP-9 en el medio condicionado, favoreciendo el proceso de invasión en las células cancerosas prostáticas. Por otro lado, en concentraciones elevadas (100 ng/mL) no se presenta diferencia significativa, lo cual podría ser asociado a la saturación del sistema.

Las VEs son partícipes en la comunicación celular y procesos fisiológicos. Contienen en su membrana fosfolípidos, proteínas transmembranales y proteínas que son componentes de las balsas lipídicas. Al mismo tiempo, dentro de las VEs, hay diversas proteínas intracelulares, segundos mensajeros y material genético que pueden ser empaquetados y transportados de un lugar a otro [87,138]. Como

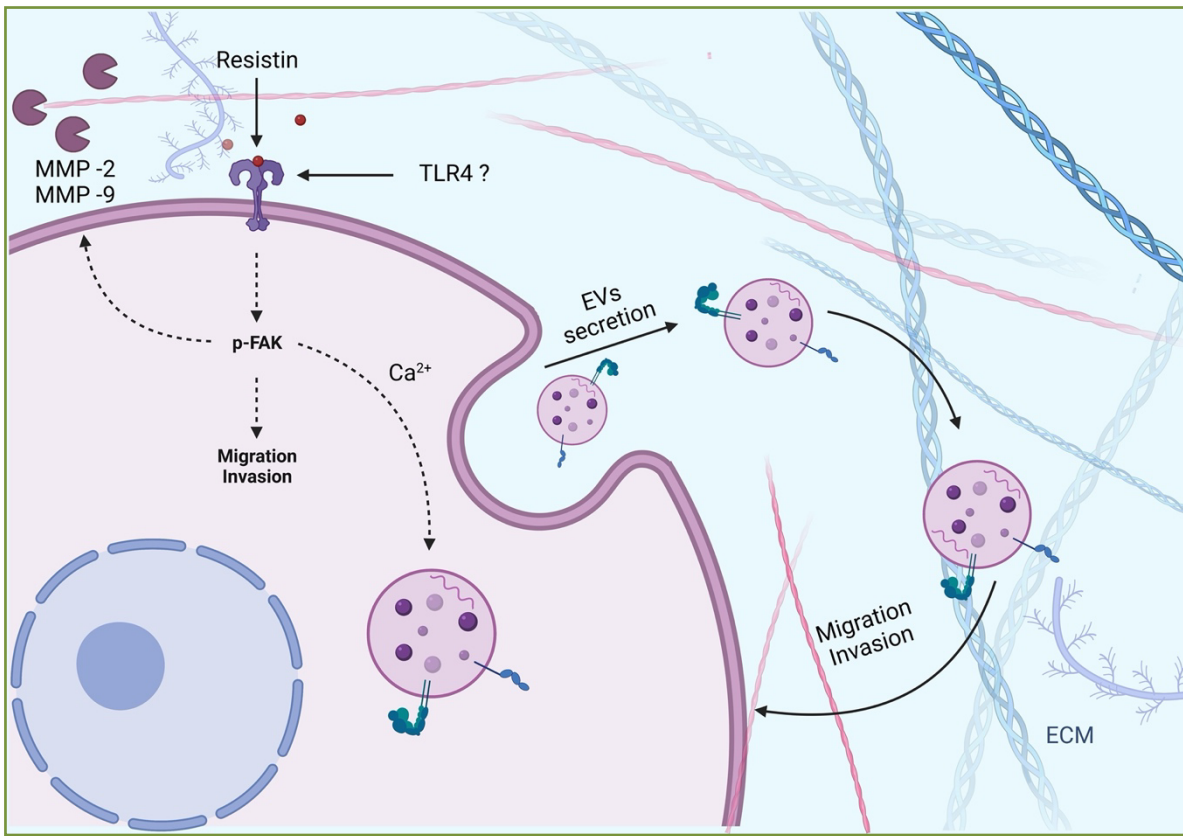
consecuencia, las propiedades y el papel biológico de las VEs pueden diferir dependiendo de la célula que son derivadas y del microambiente del que son expuestas. Las VEs pueden fusionarse con la membrana plasmática de las células, transfiriendo información genética, segundos mensajeros y receptores que pueden inducir la señalización celular, mediante los cuales la célula receptora puede adquirir nuevas funciones [87,138]. La secreción de VEs por las células cancerosas representa un mecanismo por el cual moléculas bioactivas como ácidos nucleicos, receptores, receptores de factores de crecimiento, factores de transcripción funcionales, enzimas y varios tipos de proteínas intracelulares son transferidas pudiendo modular vías de señalización. Además, las VEs se secretan en respuesta a una amplia variedad de estímulos, liberados en altas concentraciones por células cancerígenas. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la resistina podría regular la comunicación celular mediada por EV en las células PC3. Nuestros resultados indican que la resistina induce la secreción de VEs que promueven los procesos de migración e invasión en células PC3, simulando un modelo de comunicación autocrino. La secreción de VEs derivadas del tratamiento con resistina puede verse respaldada por el hecho de que, en las células de cáncer de mama altamente invasivas MDA-MB-231, la resistina promueve un aumento en concentración de calcio intracelular, un fenómeno conocido por inducir la secreción de EVs [87,138]. Las VEs contienen una variedad de moléculas cargo que promueven los procesos de invasión y metástasis, incluyendo a proteínas como PI3K/AKT, integrina  $\alpha\beta 5$ , EGFRvIII y una amplia variedad de miRNAs [129,135]. Esto sugiere fuertemente que las células PC3 expuestas a resistina secretan VEs con moléculas cargo que inducen invasión y metástasis, destacando la importancia del papel de resistina en la progresión tumoral prostática. Sin embargo, se requieren más ensayos para respaldar estos eventos. Nuestros datos indican que la fracción enriquecida con EVs presenta Flot-2 y CD63; sin embargo, es necesario caracterizar las poblaciones de VEs mediante microscopía electrónica y/o el análisis de seguimiento de nanopartículas. La resistina es una proteína secretada tanto por células como por macrófagos, además, regula la respuesta inflamatoria al promover la secreción de TNF-alfa e IL-12 en macrófagos [139]. Estos efectos podrían ser inducidos por su

posible interacción y activación con TLR4 [79,87]. Se ha observado que la activación de TLR4 genera un incremento en la liberación de calcio [140,141] desde el retículo endoplásmico al citoplasma (calcio intracelular).

En las células cancerosas, la resistina promueve la fosforilación de Src (un objetivo río abajo de la quinasa FAK) y el aumento de los niveles de calcio intracelular [87]. Se ha demostrado que la vía FAK/Src induce la activación de Akt en células cancerosas. Esto resulta en una mayor secreción de MMP-2 y MMP-9, favoreciendo los fenómenos de la proliferación, migración, invasión y metástasis [142]. Particularmente, un aumento en los niveles de calcio intracelular es clave en la biogénesis y secreción de microvesículas y exosomas por parte de las células tumorales [138]. En conjunto de toda la evidencia presentada, planteamos la hipótesis de que, en células PC3, la resistina interactúa y activa a TLR4, aumentando los niveles de p-FAK en conjunto con los niveles de calcio intracelular. La activación de FAK promueve la fosforilación de p-Src y la actividad de la vía PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B, la cual aumenta la secreción de MMP-2 y MMP-9, favoreciendo los procesos de proliferación, migración e invasión en células PC3. Además, el aumento de los niveles de calcio intracelular genera un aumento en la biogénesis de VEs y secreción de moléculas cargo, las cuales inducen el proceso de invasión de las células PC3.

En resumen, nuestros datos muestran por primera vez que la resistina desencadena la invasión en células PC3. Además, las células PC3 tratadas con resistina secretan EVs que inducen la migración e Invasión de células prostáticas PC3. Esto destaca a la resistina como una adipocina importante en la progresión tumoral y en la metástasis del cáncer prostático.

## XII. Resumen gráfico



### **XIII. Conclusiones**

- Se determinó que Resistina presenta un incremento en la actividad de la cinasa FAK (p-FAK-Tyr397), concomitantemente del aumento en la migración de células PC3.
- Resistina modula la secreción de las metaloproteinasas -2 y -9, las cuales están involucradas en el proceso de la invasión celular.
- El estímulo de Resistina incrementa el tamaño de esferoides conformado por células prostáticas cancerígenas.
- Células PC3 estimuladas con Resistina generan un aumento de la MMP -9 presente en VEs.
- Las VEs obtenidas de medios condicionados de células PC3 estimuladas con resistina, incrementan la agresividad celular mediante el proceso de invasión.

## XVI. Referencia bibliografica

1. Thompson, I.M., Jr.; Cabang, A.B.; Wargovich, M.J. Future directions in the prevention of prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2014**, *11*, 49-60, doi:10.1038/nrclinonc.2013.211.
2. Murillo-Garzon, V.; Kypka, R. WNT signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **2017**, *14*, 683-696, doi:10.1038/nrurol.2017.144.
3. Ku, S.Y.; Gleave, M.E.; Beltran, H. Towards precision oncology in advanced prostate cancer. *Nat Rev Urol* **2019**, *16*, 645-654, doi:10.1038/s41585-019-0237-8.
4. Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **2020**, *70*, 313, doi:10.3322/caac.21609.
5. Teroerde, M.; Nientiedt, C.; Duensing, A.; Hohenfellner, M.; Stenzinger, A.; Duensing, S. Revisiting the Role of p53 in Prostate Cancer. In *Prostate Cancer*, Bott, S.R.J., Ng, K.L., Eds.; Brisbane (AU), 2021.
6. Lin, S.R.; Mokgautsi, N.; Liu, Y.N. Ras and Wnt Interaction Contribute in Prostate Cancer Bone Metastasis. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25102380.
7. Ye, Z.; Xia, Y.; Li, L.; Li, B.; Chen, W.; Han, S.; Zhou, X.; Chen, L.; Yu, W.; Ruan, Y.; et al. Effect of transmembrane protein 100 on prostate cancer progression by regulating SCNN1D through the FAK/PI3K/AKT pathway. *Transl Oncol* **2023**, *27*, 101578, doi:10.1016/j.tranon.2022.101578.
8. Wu, D.; Ni, J.; Beretov, J.; Cozzi, P.; Willcox, M.; Wasinger, V.; Walsh, B.; Graham, P.; Li, Y. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Crit Rev Oncol Hematol* **2017**, *118*, 15-26, doi:10.1016/j.critrevonc.2017.08.002.
9. Sonpavde, G. The biology of prostate cancer metastases: does oligo differ from polymetastatic? *Curr Opin Urol* **2017**, *27*, 542-546, doi:10.1097/MOU.0000000000000434.
10. Gao, Z.; Pang, B.; Li, J.; Gao, N.; Fan, T.; Li, Y. Emerging Role of Exosomes in Liquid Biopsy for Monitoring Prostate Cancer Invasion and Metastasis. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 679527, doi:10.3389/fcell.2021.679527.
11. Geldof, A.A.; Rao, B.R. Factors in prostate cancer metastasis. *Anticancer Res* **1990**, *10*, 1303-1306.
12. Zhang, X. Interactions between cancer cells and bone microenvironment promote bone metastasis in prostate cancer. *Cancer Commun (Lond)* **2019**, *39*, 76, doi:10.1186/s40880-019-0425-1.
13. Booth, A.; Magnuson, A.; Fouts, J.; Foster, M. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Investig* **2015**, *21*, 57-74, doi:10.1515/hmbci-2014-0037.
14. Codoner-Franch, P.; Alonso-Iglesias, E. Resistin: insulin resistance to malignancy. *Clin Chim Acta* **2015**, *438*, 46-54, doi:10.1016/j.cca.2014.07.043.
15. Iyengar, N.M.; Gucalp, A.; Dannenberg, A.J.; Hudis, C.A. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *J Clin Oncol* **2016**, *34*, 4270-4276, doi:10.1200/JCO.2016.67.4283.

16. Lee, K.; Kruper, L.; Dieli-Conwright, C.M.; Mortimer, J.E. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Curr Oncol Rep* **2019**, *21*, 41, doi:10.1007/s11912-019-0787-1.
17. Esteve Rafols, M. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr* **2014**, *61*, 100-112, doi:10.1016/j.endonu.2013.03.011.
18. Marcano, Y.; Torcat, J.; Ayala, L.; Verdi, B.; Lairet, C.; Maldonado, M.; de Vegas, J. Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo* **2006**, *4*, 15-21.
19. Marti-Nicolovius, M. [Effects of overweight and obesity on cognitive functions of children and adolescents]. *Rev Neurol* **2022**, *75*, 59-65, doi:10.33588/rn.7503.2022173.
20. Vekic, J.; Zeljkovic, A.; Stefanovic, A.; Jelic-Ivanovic, Z.; Spasojevic-Kalimanovska, V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism* **2019**, *92*, 71-81, doi:10.1016/j.metabol.2018.11.005.
21. Yazici, D.; Sezer, H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Adv Exp Med Biol* **2017**, *960*, 277-304, doi:10.1007/978-3-319-48382-5\_12.
22. Piche, M.E.; Tchernof, A.; Despres, J.P. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res* **2020**, *126*, 1477-1500, doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.316101.
23. Belladelli, F.; Montorsi, F.; Martini, A. Metabolic syndrome, obesity and cancer risk. *Curr Opin Urol* **2022**, *32*, 594-597, doi:10.1097/MOU.0000000000001041.
24. Wilson, R.L.; Taaffe, D.R.; Newton, R.U.; Hart, N.H.; Lyons-Wall, P.; Galvao, D.A. Obesity and prostate cancer: A narrative review. *Crit Rev Oncol Hematol* **2022**, *169*, 103543, doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103543.
25. McNabney, S.M.; Henagan, T.M. Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/nu9121348.
26. Calle, E.E.; Rodriguez, C.; Walker-Thurmond, K.; Thun, M.J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* **2003**, *348*, 1625-1638, doi:10.1056/NEJMoa021423.
27. Calle, E.E.; Thun, M.J. Obesity and cancer. *Oncogene* **2004**, *23*, 6365-6378, doi:10.1038/sj.onc.1207751.
28. Rodriguez, C.; Freedland, S.J.; Deka, A.; Jacobs, E.J.; McCullough, M.L.; Patel, A.V.; Thun, M.J.; Calle, E.E. Body mass index, weight change, and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2007**, *16*, 63-69, doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0754.
29. Lophatananon, A.; Archer, J.; Easton, D.; Pocock, R.; Dearnaley, D.; Guy, M.; Kote-Jarai, Z.; O'Brien, L.; Wilkinson, R.A.; Hall, A.L.; et al. Dietary fat and early-onset prostate cancer risk. *Br J Nutr* **2010**, *103*, 1375-1380, doi:10.1017/S0007114509993291.
30. Llaverias, G.; Danilo, C.; Wang, Y.; Witkiewicz, A.K.; Daumer, K.; Lisanti, M.P.; Frank, P.G. A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am J Pathol* **2010**, *177*, 3180-3191, doi:10.2353/ajpath.2010.100568.

31. Roberts, D.L.; Dive, C.; Renehan, A.G. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu Rev Med* **2010**, *61*, 301-316, doi:10.1146/annurev.med.080708.082713.
32. Kwakwa, K.A.; Sterling, J.A. Integrin alphavbeta3 Signaling in Tumor-Induced Bone Disease. *Cancers (Basel)* **2017**, *9*, doi:10.3390/cancers9070084.
33. Lu, H.; Wang, T.; Li, J.; Fedele, C.; Liu, Q.; Zhang, J.; Jiang, Z.; Jain, D.; Iozzo, R.V.; Violette, S.M.; et al. alphavbeta6 Integrin Promotes Castrate-Resistant Prostate Cancer through JNK1-Mediated Activation of Androgen Receptor. *Cancer Res* **2016**, *76*, 5163-5174, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0543.
34. Du, C.; Zheng, Z.; Li, D.; Chen, L.; Li, N.; Yi, X.; Yang, Y.; Guo, F.; Liu, W.; Xie, X.; et al. BkCa promotes growth and metastasis of prostate cancer through facilitating the coupling between alphavbeta3 integrin and FAK. *Oncotarget* **2016**, *7*, 40174-40188, doi:10.18632/oncotarget.9559.
35. Di, J.; Cao, H.; Tang, J.; Lu, Z.; Gao, K.; Zhu, Z.; Zheng, J. Rap2B promotes cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer. *Med Oncol* **2016**, *33*, 58, doi:10.1007/s12032-016-0771-7.
36. Taylor, E.B. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clin Sci (Lond)* **2021**, *135*, 731-752, doi:10.1042/CS20200895.
37. Zorena, K.; Jachimowicz-Duda, O.; Slezak, D.; Robakowska, M.; Mrugacz, M. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21103570.
38. Ren, Y.; Zhao, H.; Yin, C.; Lan, X.; Wu, L.; Du, X.; Griffiths, H.R.; Gao, D. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2022**, *13*, 873699, doi:10.3389/fendo.2022.873699.
39. Wang, J.; Liu, R.; Hawkins, M.; Barzilai, N.; Rossetti, L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* **1998**, *393*, 684-688, doi:10.1038/31474.
40. Tartaglia, L.A.; Dembski, M.; Weng, X.; Deng, N.; Culpepper, J.; Devos, R.; Richards, G.J.; Campfield, L.A.; Clark, F.T.; Deeds, J.; et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **1995**, *83*, 1263-1271, doi:10.1016/0092-8674(95)90151-5.
41. Kwon, O.; Kim, K.W.; Kim, M.S. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci* **2016**, *73*, 1457-1477, doi:10.1007/s00018-016-2133-1.
42. Mazar, R.; Friedmann-Morvinski, D.; Alsaigh, T.; Kleifeld, O.; Kistler, E.B.; Rousso-Noori, L.; Huang, C.; Li, J.B.; Verma, I.M.; Schmid-Schonbein, G.W. Cleavage of the leptin receptor by matrix metalloproteinase-2 promotes leptin resistance and obesity in mice. *Sci Transl Med* **2018**, *10*, doi:10.1126/scitranslmed.aah6324.
43. Scherer, P.E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 26746-26749, doi:10.1074/jbc.270.45.26746.
44. Yamauchi, T.; Kamon, J.; Ito, Y.; Tsuchida, A.; Yokomizo, T.; Kita, S.; Sugiyama, T.; Miyagishi, M.; Hara, K.; Tsunoda, M.; et al. Cloning of

- adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **2003**, *423*, 762-769, doi:10.1038/nature01705.
45. Hug, C.; Wang, J.; Ahmad, N.S.; Bogan, J.S.; Tsao, T.S.; Lodish, H.F. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 10308-10313, doi:10.1073/pnas.0403382101.
  46. Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Miyagawa, J.; Hotta, K.; Shimomura, I.; Nakamura, T.; Miyaoka, K.; et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *257*, 79-83, doi:10.1006/bbrc.1999.0255.
  47. Kadowaki, T.; Yamauchi, T.; Kubota, N.; Hara, K.; Ueki, K.; Tobe, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 1784-1792, doi:10.1172/JCI29126.
  48. Yamauchi, T.; Kamon, J.; Waki, H.; Terauchi, Y.; Kubota, N.; Hara, K.; Mori, Y.; Ide, T.; Murakami, K.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* **2001**, *7*, 941-946, doi:10.1038/90984.
  49. Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y.; Ito, Y.; Waki, H.; Uchida, S.; Yamashita, S.; Noda, M.; Kita, S.; Ueki, K.; et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **2002**, *8*, 1288-1295, doi:10.1038/nm788.
  50. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2014**, *6*, a016295, doi:10.1101/cshperspect.a016295.
  51. Kaur, S.; Bansal, Y.; Kumar, R.; Bansal, G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2020**, *28*, 115327, doi:10.1016/j.bmc.2020.115327.
  52. Garbers, C.; Hermanns, H.M.; Schaper, F.; Muller-Newen, G.; Grotzinger, J.; Rose-John, S.; Scheller, J. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* **2012**, *23*, 85-97, doi:10.1016/j.cytogfr.2012.04.001.
  53. Makki, K.; Froguel, P.; Wolowczuk, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* **2013**, *2013*, 139239, doi:10.1155/2013/139239.
  54. Pou, K.M.; Massaro, J.M.; Hoffmann, U.; Vasan, R.S.; Maurovich-Horvat, P.; Larson, M.G.; Keaney, J.F., Jr.; Meigs, J.B.; Lipinska, I.; Kathiresan, S.; et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* **2007**, *116*, 1234-1241, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.710509.
  55. Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **1993**, *259*, 87-91, doi:10.1126/science.7678183.
  56. Khanna, D.; Welch, B.S.; Rehman, A. Pathophysiology of Obesity. In *StatPearls*; Treasure Island (FL), 2023.

57. Li, F.P.; He, J.; Li, Z.Z.; Luo, Z.F.; Yan, L.; Li, Y. Effects of resistin expression on glucose metabolism and hepatic insulin resistance. *Endocrine* **2009**, *35*, 243-251, doi:10.1007/s12020-009-9148-4.
58. Black, R.A.; Rauch, C.T.; Kozlosky, C.J.; Peschon, J.J.; Slack, J.L.; Wolfson, M.F.; Castner, B.J.; Stocking, K.L.; Reddy, P.; Srinivasan, S.; et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **1997**, *385*, 729-733, doi:10.1038/385729a0.
59. Para, I.; Albu, A.; Porojan, M.D. Adipokines and Arterial Stiffness in Obesity. *Medicina (Kaunas)* **2021**, *57*, doi:10.3390/medicina57070653.
60. Gerber, M.; Boettner, A.; Seidel, B.; Lammert, A.; Bar, J.; Schuster, E.; Thiery, J.; Kiess, W.; Kratzsch, J. Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab* **2005**, *90*, 4503-4509, doi:10.1210/jc.2005-0437.
61. Joshi, R.K.; Lee, S.A. Obesity related adipokines and colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* **2014**, *15*, 397-405, doi:10.7314/apjcp.2014.15.1.397.
62. Patel, L.; Buckels, A.C.; Kinghorn, I.J.; Murdock, P.R.; Holbrook, J.D.; Plumpton, C.; Macphee, C.H.; Smith, S.A. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *300*, 472-476, doi:10.1016/s0006-291x(02)02841-3.
63. Raghu, P.; Ghosh, S.; Soundarya, K.; Haseeb, A.; Aruna, B.; Ehtesham, N.Z. Dimerization of human recombinant resistin involves covalent and noncovalent interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *313*, 642-646, doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.156.
64. Daquinag, A.C.; Zhang, Y.; Amaya-Manzanares, F.; Simmons, P.J.; Kolonin, M.G. An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 74-86, doi:10.1016/j.stem.2011.05.017.
65. Sanchez-Solana, B.; Laborda, J.; Baladron, V. Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Mol Endocrinol* **2012**, *26*, 110-127, doi:10.1210/me.2011-1027.
66. Lee, S.; Lee, H.C.; Kwon, Y.W.; Lee, S.E.; Cho, Y.; Kim, J.; Lee, S.; Kim, J.Y.; Lee, J.; Yang, H.M.; et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab* **2014**, *19*, 484-497, doi:10.1016/j.cmet.2014.01.013.
67. Tarkowski, A.; Bjersing, J.; Shestakov, A.; Bokarewa, M.I. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *J Cell Mol Med* **2010**, *14*, 1419-1431, doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00899.x.
68. Senolt, L.; Housa, D.; Vernerova, Z.; Jirasek, T.; Svobodova, R.; Veigl, D.; Anderlova, K.; Muller-Ladner, U.; Pavelka, K.; Haluzik, M. Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann Rheum Dis* **2007**, *66*, 458-463, doi:10.1136/ard.2006.054734.
69. Son, Y.M.; Ahn, S.M.; Jang, M.S.; Moon, Y.S.; Kim, S.H.; Cho, K.K.; Han, S.H.; Yun, C.H. Immunomodulatory effect of resistin in human dendritic cells stimulated with lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *376*, 599-604, doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.037.

70. Ilic, M.; Ilic, I. Epidemiology of stomach cancer. *World J Gastroenterol* **2022**, *28*, 1187-1203, doi:10.3748/wjg.v28.i12.1187.
71. Fonteneau, G.; Redding, A.; Hoag-Lee, H.; Sim, E.S.; Heinrich, S.; Gaida, M.M.; Grabocka, E. Stress Granules Determine the Development of Obesity-Associated Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* **2022**, *12*, 1984-2005, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1672.
72. Sohn, W.; Lee, H.W.; Lee, S.; Lim, J.H.; Lee, M.W.; Park, C.H.; Yoon, S.K. Obesity and the risk of primary liver cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Mol Hepatol* **2021**, *27*, 157-174, doi:10.3350/cmh.2020.0176.
73. Parida, S.; Siddharth, S.; Sharma, D. Adiponectin, Obesity, and Cancer: Clash of the Bigwigs in Health and Disease. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20102519.
74. Socol, C.T.; Chira, A.; Martinez-Sanchez, M.A.; Nunez-Sanchez, M.A.; Maerescu, C.M.; Mierlita, D.; Rusu, A.V.; Ruiz-Alcaraz, A.J.; Trif, M.; Ramos-Molina, B. Leptin Signaling in Obesity and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23094713.
75. Medzhitov, R.; Janeway, C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **2002**, *296*, 298-300, doi:10.1126/science.1068883.
76. Ciesielska, A.; Matyjek, M.; Kwiatkowska, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* **2021**, *78*, 1233-1261, doi:10.1007/s00018-020-03656-y.
77. Kaya, S.T. Effects of diazoxide on streptozotocin induced beta cell damage via HSP70/HSP90/TLR4/AMPK signaling pathways. *Biotech Histochem* **2023**, *98*, 210-219, doi:10.1080/10520295.2023.2168757.
78. Sanchez-Zauco, N.A.; Giono-Cerezo, S.; Maldonado-Bernal, C. [Toll-like receptors, pathogenesis and immune response to *Helicobacter pylori*]. *Salud Publica Mex* **2010**, *52*, 447-454, doi:10.1590/s0036-36342010000500012.
79. Wang, C.H.; Wang, P.J.; Hsieh, Y.C.; Lo, S.; Lee, Y.C.; Chen, Y.C.; Tsai, C.H.; Chiu, W.C.; Chu-Sung Hu, S.; Lu, C.W.; et al. Resistin facilitates breast cancer progression via TLR4-mediated induction of mesenchymal phenotypes and stemness properties. *Oncogene* **2018**, *37*, 589-600, doi:10.1038/onc.2017.357.
80. Singh, S.; Chouhan, S.; Mohammad, N.; Bhat, M.K. Resistin causes G1 arrest in colon cancer cells through upregulation of SOCS3. *FEBS Lett* **2017**, *591*, 1371-1382, doi:10.1002/1873-3468.12655.
81. Hsieh, Y.Y.; Shen, C.H.; Huang, W.S.; Chin, C.C.; Kuo, Y.H.; Hsieh, M.C.; Yu, H.R.; Chang, T.S.; Lin, T.H.; Chiu, Y.W.; et al. Resistin-induced stromal cell-derived factor-1 expression through Toll-like receptor 4 and activation of p38 MAPK/ NFkappaB signaling pathway in gastric cancer cells. *J Biomed Sci* **2014**, *21*, 59, doi:10.1186/1423-0127-21-59.
82. Lee, S.; Rauch, J.; Kolch, W. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21031102.
83. Chan, J.M.; Zaidi, S.; Love, J.R.; Zhao, J.L.; Setty, M.; Wadosky, K.M.; Gopalan, A.; Choo, Z.N.; Persad, S.; Choi, J.; et al. Lineage plasticity in

- prostate cancer depends on JAK/STAT inflammatory signaling. *Science* **2022**, 377, 1180-1191, doi:10.1126/science.abn0478.
84. Shang, J.; Yu, Z.; Xiong, C.; Zhang, J.; Gong, J.; Yu, C.; Huang, Y.; Zhou, X. Resistin targets TAZ to promote osteogenic differentiation through PI3K/AKT/mTOR pathway. *iScience* **2023**, 26, 107025, doi:10.1016/j.isci.2023.107025.
  85. Li, B.; Fang, J.; He, T.; Yin, S.; Yang, M.; Cui, H.; Ma, X.; Deng, J.; Ren, Z.; Hu, Y.; et al. Resistin up-regulates LPL expression through the PPARgamma-dependent PI3K/AKT signaling pathway impacting lipid accumulation in RAW264.7 macrophages. *Cytokine* **2019**, 119, 168-174, doi:10.1016/j.cyto.2019.03.016.
  86. Kim, H.J.; Lee, Y.S.; Won, E.H.; Chang, I.H.; Kim, T.H.; Park, E.S.; Kim, M.K.; Kim, W.; Myung, S.C. Expression of resistin in the prostate and its stimulatory effect on prostate cancer cell proliferation. *BJU Int* **2011**, 108, E77-83, doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09813.x.
  87. Lee, J.O.; Kim, N.; Lee, H.J.; Lee, Y.W.; Kim, S.J.; Park, S.H.; Kim, H.S. Resistin, a fat-derived secretory factor, promotes metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells through ERM activation. *Sci Rep* **2016**, 6, 18923, doi:10.1038/srep18923.
  88. van Niel, G.; D'Angelo, G.; Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, 19, 213-228, doi:10.1038/nrm.2017.125.
  89. Urabe, F.; Kosaka, N.; Ito, K.; Kimura, T.; Egawa, S.; Ochiya, T. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* **2020**, 318, C29-C39, doi:10.1152/ajpcell.00280.2019.
  90. Yanez-Mo, M.; Siljander, P.R.; Andreu, Z.; Zavec, A.B.; Borrás, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* **2015**, 4, 27066, doi:10.3402/jev.v4.27066.
  91. Cocozza, F.; Grisard, E.; Martin-Jaular, L.; Mathieu, M.; Thery, C. SnapShot: Extracellular Vesicles. *Cell* **2020**, 182, 262-262 e261, doi:10.1016/j.cell.2020.04.054.
  92. Gould, S.J.; Raposo, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **2013**, 2, doi:10.3402/jev.v2i0.20389.
  93. Muralidharan-Chari, V.; Clancy, J.W.; Sedgwick, A.; D'Souza-Schorey, C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* **2010**, 123, 1603-1611, doi:10.1242/jcs.064386.
  94. Thery, C.; Zitvogel, L.; Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2002**, 2, 569-579, doi:10.1038/nri855.
  95. van Doornaal, F.F.; Kleinjan, A.; Di Nisio, M.; Buller, H.R.; Nieuwland, R. Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med* **2009**, 67, 266-273.
  96. Liu, C.; He, D.; Li, L.; Zhang, S.; Wang, L.; Fan, Z.; Wang, Y. Extracellular vesicles in pancreatic cancer immune escape: Emerging roles and mechanisms. *Pharmacol Res* **2022**, 183, 106364, doi:10.1016/j.phrs.2022.106364.

97. Dai, J.; Shupp, A.B.; Bussard, K.M.; Keller, E.T. Extracellular Vesicles and Bone-Associated Cancer. *Curr Osteoporos Rep* **2021**, *19*, 223-229, doi:10.1007/s11914-021-00668-w.
98. Lucotti, S.; Kenific, C.M.; Zhang, H.; Lyden, D. Extracellular vesicles and particles impact the systemic landscape of cancer. *EMBO J* **2022**, *41*, e109288, doi:10.15252/embj.2021109288.
99. Bebelman, M.P.; Smit, M.J.; Pegtel, D.M.; Baglio, S.R. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther* **2018**, *188*, 1-11, doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.013.
100. Galindo-Hernandez, O.; Gonzales-Vazquez, C.; Cortes-Reynosa, P.; Reyes-Uribe, E.; Chavez-Ocana, S.; Reyes-Hernandez, O.; Sierra-Martinez, M.; Salazar, E.P. Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol* **2015**, *36*, 9649-9659, doi:10.1007/s13277-015-3711-9.
101. Inal, J.M.; Ansa-Addo, E.A.; Stratton, D.; Kholia, S.; Antwi-Baffour, S.S.; Jorfi, S.; Lange, S. Microvesicles in health and disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2012**, *60*, 107-121, doi:10.1007/s00005-012-0165-2.
102. Galindo-Hernandez, O.; Serna-Marquez, N.; Castillo-Sanchez, R.; Salazar, E.P. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2014**, *91*, 299-310, doi:10.1016/j.plefa.2014.09.002.
103. Valadi, H.; Ekstrom, K.; Bossios, A.; Sjostrand, M.; Lee, J.J.; Lotvall, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **2007**, *9*, 654-659, doi:10.1038/ncb1596.
104. Lopez-Plaza, B.; Loria-Kohen, V.; Gonzalez-Rodriguez, L.G.; Fernandez-Cruz, E. [Diet and lifestyle in cancer prevention]. *Nutr Hosp* **2022**, *39*, 74-77, doi:10.20960/nh.04317.
105. Barquera, S.; Campos, I. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Pública de México* **2013**, *55*, 151, doi:10.21149/spm.v55s2.5111.
106. Slabuszewska-Jozwiak, A.; Lukaszuk, A.; Janicka-Kosnik, M.; Wdowiak, A.; Jakiel, G. Role of Leptin and Adiponectin in Endometrial Cancer. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23105307.
107. Kieliszek, M.; Blazejak, S.; Placzek, M. Spectrophotometric evaluation of selenium binding by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 and *Candida utilis* ATCC 9950 yeast. *J Trace Elem Med Biol* **2016**, *35*, 90-96, doi:10.1016/j.jtemb.2016.01.014.
108. Li, Y.; Yang, Q.; Cai, D.; Guo, H.; Fang, J.; Cui, H.; Gou, L.; Deng, J.; Wang, Z.; Zuo, Z. Resistin, a Novel Host Defense Peptide of Innate Immunity. *Front Immunol* **2021**, *12*, 699807, doi:10.3389/fimmu.2021.699807.
109. Gao, Y.; Chen, X.; He, Q.; Gimple, R.C.; Liao, Y.; Wang, L.; Wu, R.; Xie, Q.; Rich, J.N.; Shen, K.; et al. Adipocytes promote breast tumorigenesis through TAZ-dependent secretion of Resistin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2020**, *117*, 33295-33304, doi:10.1073/pnas.2005950117.

110. Zhou, L.; Li, J.Y.; He, P.P.; Yu, X.H.; Tang, C.K. Resistin: Potential biomarker and therapeutic target in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* **2021**, *512*, 84-91, doi:10.1016/j.cca.2020.11.010.
111. Tai, Y.L.; Chen, L.C.; Shen, T.L. Emerging roles of focal adhesion kinase in cancer. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 690690, doi:10.1155/2015/690690.
112. Zhao, X.; Guan, J.L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *63*, 610-615, doi:10.1016/j.addr.2010.11.001.
113. Tapial Martinez, P.; Lopez Navajas, P.; Lietha, D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/biom10020179.
114. Calalb, M.B.; Polte, T.R.; Hanks, S.K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* **1995**, *15*, 954-963, doi:10.1128/MCB.15.2.954.
115. Dalton, G.D.; Peterson, L.J.; Howlett, A.C. CB(1) cannabinoid receptors promote maximal FAK catalytic activity by stimulating cooperative signaling between receptor tyrosine kinases and integrins in neuronal cells. *Cell Signal* **2013**, *25*, 1665-1677, doi:10.1016/j.cellsig.2013.03.020.
116. Mitra, S.K.; Schlaepfer, D.D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* **2006**, *18*, 516-523, doi:10.1016/j.cecb.2006.08.011.
117. Zhou, J.; Yi, Q.; Tang, L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review. *J Exp Clin Cancer Res* **2019**, *38*, 250, doi:10.1186/s13046-019-1265-1.
118. Holanda, A.O.; Oliveira, A.R.; Cruz, K.J.; Severo, J.S.; Morais, J.B.; Silva, B.B.; Marreiro, D.D. Zinc and metalloproteinases 2 and 9: What is their relation with breast cancer? *Rev Assoc Med Bras (1992)* **2017**, *63*, 78-84, doi:10.1590/1806-9282.63.01.78.
119. Carey, P.; Low, E.; Harper, E.; Stack, M.S. Metalloproteinases in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22073403.
120. Yang, G.; Fan, W.; Luo, B.; Xu, Z.; Wang, P.; Tang, S.; Xu, P.; Yu, M. Circulating Resistin Levels and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int* **2016**, *2016*, 7367485, doi:10.1155/2016/7367485.
121. Miethe, C.; Raign, K.; Zamora, M.; Price, R.S. The differential role of resistin on invasive liver cancer cells. *Horm Mol Biol Clin Investig* **2023**, doi:10.1515/hmbci-2022-0063.
122. Possidonio, A.C.; Soares, C.P.; Portilho, D.M.; Midlej, V.; Benchimol, M.; Butler-Browne, G.; Costa, M.L.; Mermelstein, C. Differences in the expression and distribution of flotillin-2 in chick, mice and human muscle cells. *PLoS One* **2014**, *9*, e103990, doi:10.1371/journal.pone.0103990.
123. Lu, H.; Yang, Y.; Ou, S.; Qi, Y.; Li, G.; He, H.; Lu, F.; Li, W.; Sun, H. miRNA-382-5p Carried by Extracellular Vesicles in Osteoarthritis Reduces Cell Viability and Proliferation, and Promotes Cell Apoptosis by Targeting PTEN. *DNA Cell Biol* **2022**, *41*, 1012-1025, doi:10.1089/dna.2021.0726.
124. Ortiz, A. Extracellular vesicles in cancer progression. *Semin Cancer Biol* **2021**, *76*, 139-142, doi:10.1016/j.semcancer.2021.05.032.

125. Eguchi, T.; Sheta, M.; Fujii, M.; Calderwood, S.K. Cancer extracellular vesicles, tumoroid models, and tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* **2022**, *86*, 112-126, doi:10.1016/j.semcancer.2022.01.003.
126. Lazar, S.; Goldfinger, L.E. Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer. *Blood* **2021**, *137*, 3192-3200, doi:10.1182/blood.2019004119.
127. Acquarone, E.; Monacelli, F.; Borghi, R.; Nencioni, A.; Odetti, P. Resistin: A reappraisal. *Mech Ageing Dev* **2019**, *178*, 46-63, doi:10.1016/j.mad.2019.01.004.
128. Lazar, M.A. Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res* **2007**, *39*, 710-716, doi:10.1055/s-2007-985897.
129. Wang, Y.Y.; Hung, A.C.; Lo, S.; Yuan, S.F. Adipocytokines visfatin and resistin in breast cancer: Clinical relevance, biological mechanisms, and therapeutic potential. *Cancer Lett* **2021**, *498*, 229-239, doi:10.1016/j.canlet.2020.10.045.
130. Hasan, R.; Zhou, G.L. The Cytoskeletal Protein Cyclase-Associated Protein 1 (CAP1) in Breast Cancer: Context-Dependent Roles in Both the Invasiveness and Proliferation of Cancer Cells and Underlying Cell Signals. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20112653.
131. Sudan, S.K.; Deshmukh, S.K.; Poosarla, T.; Holliday, N.P.; Dyess, D.L.; Singh, A.P.; Singh, S. Resistin: An inflammatory cytokine with multi-faceted roles in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **2020**, *1874*, 188419, doi:10.1016/j.bbcan.2020.188419.
132. Gonzalez-Reyes, S.; Marin, L.; Gonzalez, L.; Gonzalez, L.O.; del Casar, J.M.; Lamelas, M.L.; Gonzalez-Quintana, J.M.; Vizoso, F.J. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 665, doi:10.1186/1471-2407-10-665.
133. Yang, H.; Zhou, H.; Feng, P.; Zhou, X.; Wen, H.; Xie, X.; Shen, H.; Zhu, X. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res* **2010**, *29*, 92, doi:10.1186/1756-9966-29-92.
134. Wang, E.L.; Qian, Z.R.; Nakasono, M.; Tanahashi, T.; Yoshimoto, K.; Bando, Y.; Kudo, E.; Shimada, M.; Sano, T. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* **2010**, *102*, 908-915, doi:10.1038/sj.bjc.6605558.
135. Guarino, M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* **2010**, *223*, 14-26, doi:10.1002/jcp.22011.
136. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **2018**, *18*, 533-548, doi:10.1038/s41568-018-0038-z.
137. Saraiva, D.P.; Matias, A.T.; Braga, S.; Jacinto, A.; Cabral, M.G. Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient-Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies. *Front Oncol* **2020**, *10*, 1543, doi:10.3389/fonc.2020.01543.

138. Taylor, J.; Azimi, I.; Monteith, G.; Bebawy, M. Ca(2+) mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy. *J Extracell Vesicles* **2020**, *9*, 1734326, doi:10.1080/20013078.2020.1734326.
139. Silswal, N.; Singh, A.K.; Aruna, B.; Mukhopadhyay, S.; Ghosh, S.; Ehtesham, N.Z. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *334*, 1092-1101, doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.202.
140. Tauseef, M.; Knezevic, N.; Chava, K.R.; Smith, M.; Sukriti, S.; Gianaris, N.; Obukhov, A.G.; Vogel, S.M.; Schraufnagel, D.E.; Dietrich, A.; et al. TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J Exp Med* **2012**, *209*, 1953-1968, doi:10.1084/jem.20111355.
141. Chiang, C.Y.; Veckman, V.; Limmer, K.; David, M. Phospholipase Cgamma-2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 3704-3709, doi:10.1074/jbc.C111.328559.
142. Jing, Y.; Liang, W.; Liu, J.; Zhang, L.; Wei, J.; Zhu, Y.; Yang, J.; Ji, K.; Zhang, Y.; Huang, Z. Stress-induced phosphoprotein 1 promotes pancreatic cancer progression through activation of the FAK/AKT/MMP signaling axis. *Pathol Res Pract* **2019**, *215*, 152564, doi:10.1016/j.prp.2019.152564.
143. Saraiva, D.P.; Matias, A.T.; Braga, S.; Jacinto, A.; Cabral, M.G. Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient-Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies. *Front Oncol* **2020**, *10*, 1543, doi:10.3389/fonc.2020.01543.
144. Luo Z, Zhang Y, Li F, He J, Ding H, Yan L, Cheng H. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine*. 2009 Aug;36(1):60-9. doi: 10.1007/s12020-009-9198-7. Epub 2009 May 8. PMID: 19440859.

## XV. Anexos



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
COORDINACIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO




Otorga la presente

# CONSTANCIA

**A: OREGEL CORTÉZ MARIO ISRAEL**

**POR SU DESTACADA PARTICIPACIÓN EN EL CONCURSO INSTITUCIONAL UABC-3MT 2022**  
**MODALIDAD VIRTUAL**

Mexicali, Baja California, a 12 de agosto del 2022  
"Por la realización plena del ser"

  
Dr. Juan Guillermo Vaca Rodríguez

Coordinación General de Investigación y Posgrado



6120 Executive Blvd, Ste 750 \* Rockville, Maryland 20852, USA  
 tel: 301.347.9300 \* www.ascb.org \* ascbinfo@ascb.org

Tuesday, December 13, 2022

To Whom It May Concern:

This confirms that Mario Israel Oregel Cortez attended the Cell Bio 2022 - An ASCB | EMBO Meeting held from Saturday, December 3, 2022 to Wednesday, December 7, 2022.

Sincerely,

Martin Chalfie  
 President of the ASCB Council

- OFFICERS**  
*President*  
 MARTIN CHALFIE  
*Past President*  
 RUTH LEHMANN  
*President-Elect*  
 ERIKA HOLZBAUR  
*Secretary*  
 KERRY BLOOM  
*Treasurer*  
 A. MALCOLM CAMPBELL  
*Chief Executive Officer*  
 REBECCA ALVANIA
- COUNCIL**  
 NEEDHI BHALLA  
 JORDAN RAFF  
 STEPHANIE GUPTON  
 WILLIAM BEMENT  
 CASPER HOOGENRAAD  
 ANDREW G. CAMPBELL  
 AMY S. GLADFELTER  
 ERIN D. GOLEY  
 RONG LI  
 BEATA EDYTA MIERZWA  
 VERONICA A. SEGARRA  
 LESLEY NICOLE WEAVER



ascb@support.ctimeetingtech.com

Entrada -...z@uabc.edu.mx 24 de octubre de 2022, 6:52 p.m.

Cell Bio 2022 OFFICIAL ABSTRACT Notification- Poster Selection

Para: Mario Israel Oregel Cortez, Cc: abstracts@ascb.org

[Detalles](#)

This is an official notification from the ASCB regarding your abstract submission for Cell Bio 2022-An ASCBIEMBO meeting:

Dear Mario Israel Oregel Cortez,

We are pleased to confirm that your abstract #4780, Study of the adipokine resistin as a mediator of migration, invasion and secretion of extracellular vesicles in PC3 prostate tumor cells, has been selected for poster presentation at Cell Bio 2022 at the Walter E. Washington Convention Center in Washington, DC from December 3-7.

Please follow this link to view presentation information and guidelines, and meeting registration:

<https://www.abstractsonline.com/notify/notifyIntro.asp?Mkey=9139b71d-5800-4838-ad9e-3037dd8b2ff4&NKey=59D89C0F-59F5-4C80-ADFE-2AE0782CDD8C>

Your board number and unique poster presentation number will be sent to you by November 4.

Please visit <https://www.ascb.org/cellbio2022/> for more information on the meeting.

If you are not the person who will be presenting this poster, please contact [abstracts@ascb.org](mailto:abstracts@ascb.org) by October 15 so we can update this in our publications. If you no longer wish to present a poster, please let us know by October 22 so that we do not assign a board number or presentation number to you.

We look forward to your participation in Cell Bio 2022!

Sincerely,

Alison Harris

---

**Alison Harris, CMP, DES | Director of Meetings**

American Society for Cell Biology | [www.ascb.org](http://www.ascb.org)

6120 Executive Boulevard | Suite 750 | Rockville, MD 20852

301.347.9346

Mark your calendar for [Cell Bio 2022 - an ASCBIEMBO meeting](#) this December.

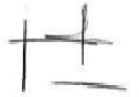
Bogotá (Colombia), Diciembre 15 de 2022

**Señores:**

Universidad Autónoma de Baja California.

El programa: Profesional en Ciencias del Deporte, de la Universidad Manuela Beltrán, emite este AGRADECIMIENTO al Maestro **Mario Israel Oregel Cortez**, de la Universidad Autónoma de Baja California, México, por su participación en el “**Conversatorio, Resultados de aprendizaje**” desarrollado el 19 de noviembre del 2022, en el marco del **comité de internacionalización del programa**.

Atentamente,



\_\_\_\_\_  
Andrés Felipe Sepúlveda Henao  
Director del Programa



**Universidad Autónoma de Baja California**  
**Coordinación General de Investigación y Posgrado**



Otorga la presente Constancia a:

***OREGEL CORTEZ MARIO ISRAEL***

Por su destacada participación en la modalidad *EXPOSICIÓN ORAL* con el título:  
***“LA RESISTINA COMO POSIBLE INDUCTORA DE INVASIÓN Y SECRECIÓN DE  
VESÍCULAS EXTRACELULARES EN CÉLULAS TUMORALES PROSTÁTICAS PC3”***

*En el área de: Medicina y Salud, Grado Académico: Posgrado*

**ATENTAMENTE**  
Mexicali, Baja California, 27 de octubre de 2022  
“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER”

  
**DR. RIGOBERTO NEGRETE URBANO**  
JEFE DE DEPARTAMENTO

  
**DR. JUAN GUILLERMO VACA RODRÍGUEZ**  
COORDINADOR GENERAL



Universidad Autónoma de Baja California  
Facultad de Deportes Campus Mexicali



Tienen el honor de otorgar el presente

# RECONOCIMIENTO

a

*Mario Israel Oregel Cortez*

Por su participación como expositor en el “Coloquio y Seminario Internacional de Investigación Estudiantil 2023-1”, desarrollando su participación en la modalidad de presentaciones orales con la temática:

**Resistina como inductora de migración e invasión en células de cáncer prosaico PC3: rol de las vesículas extracelulares**

Llevándose a cabo el día miércoles 31 de mayo del presente año, en modalidad híbrida.

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL  
Mexicali, Baja California, a mayo de 2023”

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE  
DEPORTES

Mtro. Emilio Manuel Arrayales Millán  
Director



**ANIVERSARIO**  
**FACULTAD DE**  
**DEPORTES**



an Open Access Journal by MDPI



# CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

Certificate of acceptance for the manuscript (life-2424944) titled:  
Resistin induces migration and invasion in PC3 prostate cancer cells: role of extracellular vesicles.

Authored by:

Mario Israel Oregel-Cortez; Hector Frayde-Gómez; Georgina Quintana-González; Victor García-González; José Gustavo Vazquez-Jimenez; Octavio Galindo-Hernández




has been accepted in *Life* (ISSN 2075-1729) on 20 July 2023



Basel, July 2023

Article

# Resistin Induces Migration and Invasion in PC3 Prostate Cancer Cells: Role of Extracellular Vesicles

Mario Israel Oregel-Cortez <sup>1,2,3</sup> , Héctor Frayde-Gómez <sup>1,2,4</sup>, Georgina Quintana-González <sup>1,2</sup>, Victor García-González <sup>1,2</sup> , Jose Gustavo Vazquez-Jimenez <sup>5</sup> and Octavio Galindo-Hernández <sup>1,2,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21100, Baja California, Mexico; mario.israel.oregel.cortez@uabc.edu.mx (M.I.O.-C.); fraydeh@uabc.edu.mx (H.F.-G.); quintanag@uabc.edu.mx (G.Q.-G.); vgarcia62@uabc.edu.mx (V.G.-G.)
- <sup>2</sup> Laboratorio Multidisciplinario de Estudios Metabólicos y Cáncer, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21100, Baja California, Mexico
- <sup>3</sup> Facultad de Deportes, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21289, Baja California, Mexico
- <sup>4</sup> Hospital Regional de Especialidad No. 30, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexicali 21100, Baja California, Mexico
- <sup>5</sup> Laboratorio de Fisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21100, Baja California, Mexico; gustavo.vazquez@uabc.edu.mx
- \* Correspondence: octavio.galindo@uabc.edu.mx

**Abstract:** Resistin is an adipokine with metabolic and inflammatory functions. Epidemiological and translational studies report that an increase in plasma levels and tissue expression of resistin increases the aggressiveness of prostate tumor cells. Extracellular vesicles (EVs) are secreted constitutively and induced by cytokines, growth factors, and calcium and are found in multiple biological fluids such as saliva, serum, semen, and urine. In particular, EVs have been shown to promote tumor progression through the induction of proliferation, growth, angiogenesis, resistance to chemotherapy, and metastasis. However, the role of resistin in the migration, invasion, and secretion of EVs in invasive prostate tumor cells remains to be studied. In the present study, we demonstrate that resistin induces increased migration and invasion in PC3 cells. In addition, these phenomena are accompanied by increased p-FAK levels and increased secretion of MMP-2 and MMP-9 in resistin-treated PC3 cells. Interestingly, EVs isolated from supernatants of PC3 cells treated with resistin induce an increase in migration and invasion accompanied by high MMP-2 and MMP-9 secretion in an autocrine stimulation model. In summary, our data for the first time demonstrate that resistin induces migration and invasion, partly through the secretion of EVs with pro-invasive characteristics in PC3 cells.

**Keywords:** resistin; prostate cancer; extracellular vesicles; FAK; invasion



**Citation:** Oregel-Cortez, M.I.; Frayde-Gómez, H.; Quintana-González, G.; García-González, V.; Vazquez-Jimenez, J.G.; Galindo-Hernández, O. Resistin Induces Migration and Invasion in PC3 Prostate Cancer Cells: Role of Extracellular Vesicles. *Life* **2023**, *13*, 2321. <https://doi.org/10.3390/life13122321>

Academic Editor: Juan Pablo Rigalli

Received: 15 May 2023

Revised: 10 July 2023

Accepted: 20 July 2023

Published: 10 December 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Prostate cancer is a global public health problem. According to the Global Cancer Observatory, in 2020, more than 1 million new diagnoses were reported, resulting in the deaths of more than 375,000 men worldwide [1–3]. Prostate cancer is caused by mutations in tumor suppressor genes and oncogenes such as p53, Src, FAK, and Akt, resulting in uncontrolled growth and proliferation [4]. Although prostate cancer can originate from any prostate cell, 95% of tumors originate from luminal epithelial cells [5].

Evidence links obesity with the development of multiple types of cancer [6] because adipose tissue can secrete different molecules that can regulate metabolism [7]. In addition, obesity is associated with various pathologies such as hypertension, diabetes, and prostate cancer [8]. Evidence suggests that at least 20% of all tumors are caused by excess weight, causing a more aggressive disease [9]. Adipose tissue releases more than 20 different types of adipokines, including leptin, adiponectin, TNF- $\alpha$ , and resistin, which can promote

tumor growth, proliferation, and metastasis [10]. In obesity, the paracrine communication between adipocytes and cells of the immune system is altered due, among other factors, to the deregulation of adipokine secretion, leading to low-grade chronic inflammation. The increase or decrease in the secretion of hormones, growth factors, and adipokines derived from adipose tissue promotes tumor growth, proliferation, migration, and invasion, with subsequent metastasis. In particular, in prostate cancer, the adipokines leptin, visfatin, and resistin have been related as promoters of various stages of tumor progression. However, the molecular mechanisms involved have not been fully elucidated [11,12].

Resistin (an adipose tissue-specific secretory factor) is a protein rich in cysteine residues and was originally proposed as a link between obesity and diabetes. In humans, this adipokine is found in blood circulation (2–40 ng/mL) as an oligomer and is widely expressed and secreted by macrophages infiltrating visceral adipose tissue. In contrast, adipocytes and preadipocytes express minimal protein levels [13]. Structurally, resistin has several subunits that are held together by non-covalent interactions. This characteristic allows the origination of a multimeric complex consisting of hexamer-forming disulfide bonds. Resistin-mediated transduction pathways have been described in various cancer cells, including signaling through toll-like receptor 4 (TLR4) and activation of the PI3K/Akt/NFκB pathway. Activation of these pathways can cause a chronic inflammatory state to be maintained through the constant secretion of pro-inflammatory cytokines. This can lead to a favorable tumor microenvironment. Cytokines, in turn, can activate specific pathways such as MAPKs and JAK/STAT that will promote cellular responses such as tumor proliferation [13,14]. Likewise, resistin induces the activation of PI3K concomitant with the phosphorylation and activation of Akt, resulting in increased cell proliferation in prostate cancer cells [15].

Migration and invasion are associated with cancer pathophysiology, giving rise to metastasis. Migration is associated with cell motility promoted by the participation of proteins such as Arp2/3, WASP, and Cdc42 [10]. Integrins are transmembrane receptors that couple the extracellular matrix with the cytoskeleton. Therefore, they promote cell survival and migration and promote the activation/phosphorylation of FAK at the Y397 residue, which is associated with the metastasis process [16]. Additionally, FAK overexpression and amplification are associated with tumor progression, favoring migration, invasion, metastasis, and a poor prognosis. Gelatinases are enzymes that degrade extracellular matrix components, such as collagen. It has been observed that the overexpression and increase in the secretion of MMP-2 and MMP-9 are associated with processes such as invasion, metastasis, and a poor prognosis, resulting in key factors in tumor progression [17,18].

Extracellular vesicles (EVs) are a group of vesicles bounded by a lipid bilayer and secreted by multiple cell types, including exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies. EVs secreted by tumor cells have been related to different stages of tumor progression, such as proliferation, migration, invasion, angiogenesis, metastasis, and resistance to infection and chemotherapy [19]. EV secretion is a constitutive process present in multiple cell types. However, exogenous stimuli such as growth factors, epinephrine, and adenosine diphosphate induce an increase in secretion and the differential expression of associated molecules in EVs from different cancer cell lines. The cargo molecules present in EVs, including proteins, lipids, miRNA, mRNA, and DNA, are responsible for promoting the different stages of tumor development [20]. Therefore, the composition and function of EVs as intercellular information packets depend on various factors present in the tumor microenvironment (cytokines, hormones, and growth factors, among others) [19,20].

In this work, we show that treatment with resistin induces an increase in FAK phosphorylation levels and an increase in MMP-2 and MMP-9 secretion in PC3 cancer cells. In addition, resistin promotes increased migration and invasion of PC3 cells. Interestingly, EVs isolated from supernatants from PC3 stimulated with resistin promote migration and invasion in a model of autocrine cell communication. Therefore, our data for the first time indicate that resistin induces increased migration and invasion in PC3 cells. This is

accompanied by the secretion of EVs with cargo molecules that induce processes associated with metastasis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

Resistin, FAK antibody (sc-271126), anti-phospho-FAK antibody (Tyr-397, sc-81493), anti-CD63 antibody (sc-5275), anti-actin antibody, and agarose were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Flotillin-2 antibody and basement membrane matrix (BD Matrigel) were obtained from BD Biosciences (Bedford, MA, USA).

### 2.2. Cell Culture

The PC3 prostate cancer cells were cultured in 100 mm Petri dishes with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 3.7 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (FBS), and antibiotics in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C. For experimental purposes, PC3 cells were starved in DMEM without FBS for 18 h before treatment with resistin.

### 2.3. Stimulation of PC3 Cancer Cells with Resistin

After starvation,  $8 \times 10^6$  PC3 cells (confluent cultures) were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), re-fed in DMEM without FBS, and then untreated or treated with resistin at various concentrations and times indicated. The stimulation was terminated by aspirating the conditioned medium.

### 2.4. Isolation of EVs from Conditioned Medium of PC3 Cells Stimulated with Resistin

PC3 cells were maintained and cultured in DMEM with 10% FBS (with serum EVs). Once the cultures reached 80–90% confluence ( $8 \times 10^6$  cells/dish), they were starved by removing this DMEM-FBS and replacing it with DMEM only (without FBS) for 18 h. At the end of this period, the cells were treated with and without resistin using only DMEM (without FBS) medium for 48 h. Therefore, our experimental conditions do not include the presence of FBS. Conditioned medium (supernatant) was collected from PC3 cells that were unstimulated and stimulated with resistin (25 ng/mL). Isolation of EVs was performed as described previously [21–23]. Briefly, the conditioned medium was centrifuged twice for 15 min at  $200 \times g$ . Supernatants were then sequentially centrifuged at  $600 \times g$  twice for 30 min, once at  $2000 \times g$  for 30 min, once at  $10,000 \times g$  for 30 min, and once at  $120,000 \times g$  for 75 min. Finally, the EVs were washed once with PBS 1X at  $120,000 \times g$  for 75 min. After centrifugation at  $120,000 \times g$ , the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 1X PBS ( $\approx 100 \mu\text{L}/\text{condition}$ ). The EV fractions were enriched in exosomes and microvesicles. Finally, the protein levels in the EV fraction were analyzed using the micro-Bradford protein assay.

### 2.5. Treatment of PC3 Cells with EV Fractions Isolated from Supernatants of PC3 Cells Stimulated with Resistin

Confluent cultures of PC3 cells were washed twice with PBS, re-fed in DMEM for 30 min, and then stimulated with EV fractions obtained from  $8 \times 10^6$  PC3 cells unstimulated or stimulated with resistin (25 ng/mL). Each condition was treated with  $30 \mu\text{g}/\text{mL}$  of EVs. EVs stimulation was terminated by aspirating the medium, and/or cells were solubilized in 0.5 mL of ice-cold RIPA buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphates, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM NaF, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 50 mM HEPES, pH 7.4). The micro-Bradford protein assay analyzed the protein concentration of each sample.

### 2.6. Western Blotting

Proteins ( $\approx 20 \mu\text{g}/\text{condition}$ ) were processed by PAGE under denaturing conditions with 10% gels and transferred to nitrocellulose membranes or, alternatively, PVDF. Membranes were stained with Ponceau red to confirm protein transfer to the membrane. Next,

the membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in PBS pH 7.2/0.1% Tween 20 (wash buffer) and incubated with the indicated primary antibody at 4 °C overnight. The membranes were washed three or four times with the washing buffer for 15 min and incubated with the secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated) at room temperature. After incubation, the membranes were washed to remove excess antibodies and visualize the bands with ECL detection reagent. Autoradiograms were scanned or photographed with the ChemiDoc XRS+. The bands were analyzed with the ImageJ software (1.54c version, NIH, Bethesda, MD, USA), while the statistical analysis was performed with GraphPad Prism (version 8.0.2, 263, January 2019).

### 2.7. Scratch Wound Assay

Cultures of PC3 cells (100% confluent) were exposed to 12  $\mu$ M mitomycin C to block cell proliferation.

Cell cultures were scratch-wounded using a sterile 200  $\mu$ L pipette tip, washed twice with PBS, and re-fed with DMEM stimulated or unstimulated with resistin or EV fractions from  $8 \times 10^6$  PC3 cells stimulated or unstimulated with resistin. The progress of cell migration into the wound was photographed at the end of the experiment (48 h) using an inverted microscope coupled to a camera. Each experimental condition was repeated three times.

### 2.8. Zymography

Confluent cultures of PC3 cells were treated with resistin or EV fractions obtained from  $8 \times 10^6$  PC3 cells unstimulated or stimulated with 25 ng/mL resistin for 48 h (experimental condition), and conditioned medium was collected and concentrated using centricon filters (Millipore, Burlington, MA, USA). An equal volume of non-heated conditioned medium samples was mixed with 5X non-reducing sample buffer (2.5% SDS, 1% sucrose, and 4  $\mu$ g/mL phenol red) without reducing agent and loaded onto 8% acrylamide gels copolymerized with gelatin at 1 mg/mL. Gels were rinsed thrice in 2.5% Triton X-100 and then incubated in incubation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4 and 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) at 37 °C for 48 h. Gels were fixed and stained with a staining solution (0.25% Coomassie Brilliant Blue G-250 in 10% acetic acid and 30% methanol). The gels were washed twice with the destaining solution (40% methanol and 10% acetic acid) to remove the excess stain. Proteolytic activity was detected as clear bands against the background stain of the undigested substrate.

### 2.9. Invasion Assays

Invasion assays were performed by the modified Boyden chamber method in 24-well plates containing 12 cell culture inserts with 8  $\mu$ m pore size (Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA). Briefly, 30  $\mu$ L of BD Matrigel was added to culture inserts and incubated for 30 min at 37 °C. Cells were plated at  $1 \times 10^5$  per insert in 100  $\mu$ L serum-free DMEM in the top chamber. The lower chamber contained 600  $\mu$ L DMEM with resistin (25 ng/mL) or EV fractions from PC3 cells unstimulated or stimulated with resistin. After 48 h of incubation, PC3 cells and the Matrigel were removed from the upper surface with cotton swabs, while the cells that invaded were fixed with 100% methanol for 5 min. Next, the cells were stained with 0.1% crystal violet in PBS. The dye was eluted with 500  $\mu$ L of 10% acetic acid, and the absorbance at 600 nm was measured. Background values were obtained from wells without cells.

### 2.10. Spheroid Growth Assay (3D Culture)

The development of the spheroid assay was based on the protocol of Saraiva et al. [24], with some modifications. Briefly, 24-well plates were coated with 1.5% agarose dissolved in 1X PBS (400  $\mu$ L/well). PC3 cell cultures (90% confluence) were trypsinized, and the cell suspension ( $1 \times 10^5$  cells/well) was placed on the agarose-coated wells. The spheroids were cultured under the indicated conditions (DMEM with 5% FBS alone or DMEM supplemented with 25 ng/mL resistin + 5% FBS) for seven days, changing the fresh

medium every 48 h. During the experiment, photos were taken on days 3, 5, and 7 with a camera-coupled microscope. The spheroidal area was analyzed with the ImageJ software (Bethesda, MD, USA; 1.54c version). For each time point, the areas of four spheroids were averaged. Statistical analyzes were performed using Student's *t*-tests.

#### 2.11. Statistical Analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Newman–Keuls's multiple comparison test. A statistical probability of  $p < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Resistin Induces an Increase in the Migration in PC3 Cancer Cells

Resistin overexpression has been reported in high-grade tumor tissue compared with low-grade lesions and benign prostatic hyperplasia [15,25]. High-grade lesions are associated with a high metastatic capacity, involving cell migration and invasion [15,25]. Therefore, we decided to evaluate the effect of resistin on cell migration in PC3 cells by scratch wound assay. PC3 cell cultures were scratch-wounded and stimulated at different resistin concentrations (10, 25, 50, and 100 ng/mL) and 10% FBS as a positive control for 48 h. As observed in Figure 1A, resistin promotes an increase in the migration of PC3 cells, with a maximum migration at 25 ng/mL of resistin. Since a high migratory capacity of PC3 cells treated with resistin at 25 ng/mL was observed, we decided to use this condition for all subsequent experiments. FAK is a non-receptor tyrosine kinase that is overexpressed in prostate cancer and regulates processes such as migration and invasion by modulating the dynamics of focal adhesions. Therefore, we decided to evaluate the effect of resistin on the levels of Tyr-397 phosphorylation of FAK, indicative of maximum catalytic activity [26]. Cell lysates from PC3 cells stimulated with and without resistin at 25 ng/mL at the indicated times were obtained and processed by Western blotting with anti-p-FAK (Tyr-397), anti-FAK, and anti-actin antibodies as loading controls. Our data indicate that treatment of PC3 cells with resistin induces a time-dependent increase in FAK phosphorylation levels, with a maximum phosphorylation level at 60 min of treatment (Figure 1B). As an inhibitor of cell proliferation, they were pre-treated with mitomycin C (Figure S1).

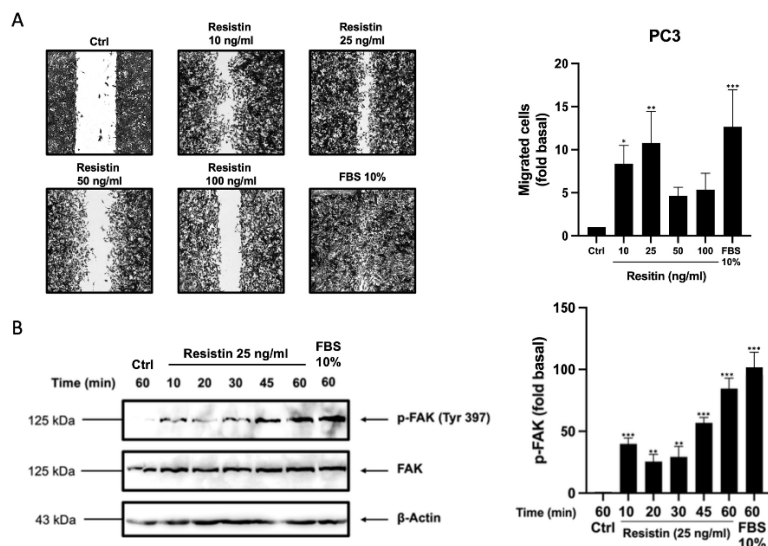
#### 3.2. Resistin Promotes an Increase in the Invasion in PC3 Cells

MMP-2 and MMP-9 are gelatinases involved in the invasion and metastasis of cancer cells, and their synthesis and secretion are regulated by pathways such as MAPK and FAK/Src. In line with this notion, we determined the impact of resistin on the secretion of MMP-2 and MMP-9. Briefly, confluent PC3 cell cultures were treated with or without 25 ng/mL resistin for 48 h, at which time the conditioned medium was obtained and processed by zymography. As shown in Figure 2A, resistin-treated PC3 cells significantly increase the secretion of MMP-2 and MMP-9 in conditioned medium. High expression and secretion of MMP-2 and MMP-9 have been associated with increased prostatic tumor invasion, an important phenomenon for subsequent tumor metastasis [27,28]. Based on previous data indicating that resistin induces the secretion of MMPs, the role of resistin in tumor invasion was evaluated. The invasion assay was performed by the Boyden chamber method. The inserts were coated with Matrigel, and  $1 \times 10^5$  cells/well were placed, while in the lower chamber was added DMEM supplemented or not with resistin and FBS as a positive control. Our data indicate that resistin induces a significant increase in the invasive capacity of PC3 cells (Figure 2B).

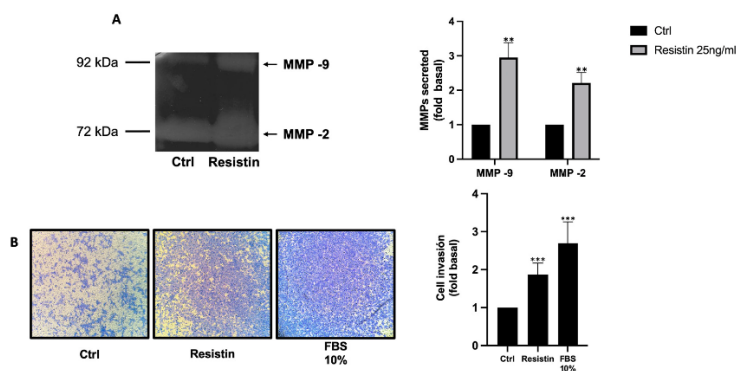
#### 3.3. Resistin Induces an Increase in 3D Culture Spheroid Growth in PC3 Cells

Our previous data show that resistin increases PC3 cell invasion. Therefore, we decided to examine the role of resistin in spheroid formation (3D cultures) in PC3 cells. PC3 cells were seeded in 24-well plates coated with 1.5% agarose. PC3 cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were treated with 5% FBS or resistin (25 ng/mL) + 5% FBS for 7 days. Finally, photos were taken on days 3, 5, and 7. As shown in Figure 3, our data indicate that resistin + 5% FBS

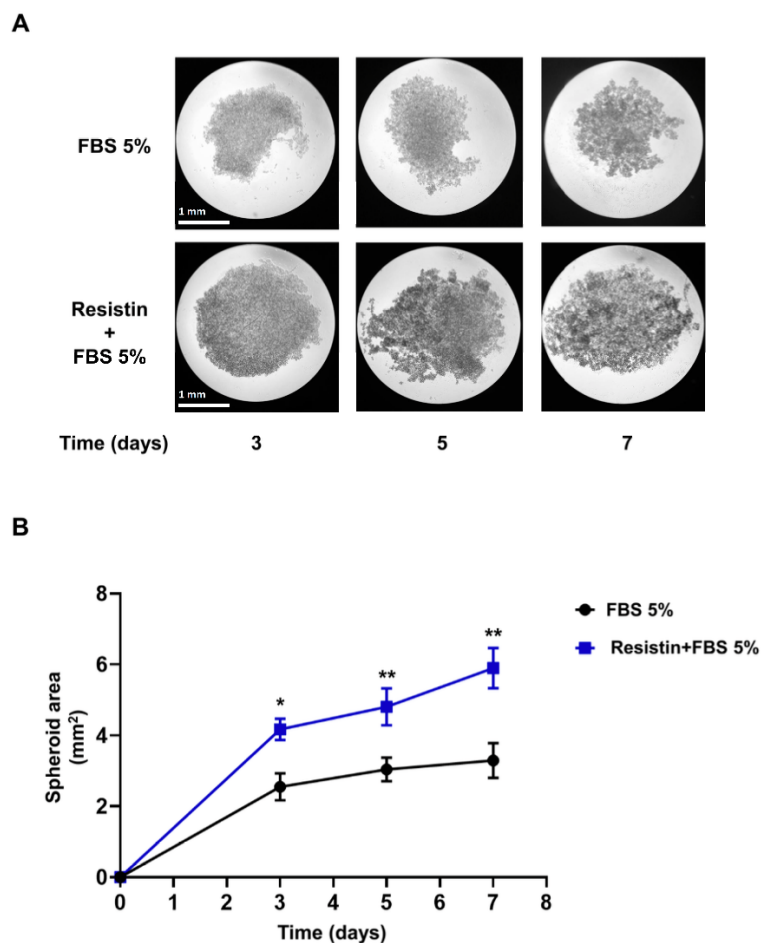
induces a significant growth of the spheroids, doubling the area of the spheroid on day 7 of treatment with respect to the condition with 5% FBS alone.



**Figure 1.** Resistin induces migration in prostate cancer cells. (A) Cell migration was evaluated through a scratch wound assay. Cells were treated with different concentrations of resistin, and the migration of cells was analyzed after 48 h. (B) Cell lysates of PC3 cells treated with or without resistin were analyzed with Western blotting to evaluate p-FAK and FAK levels and actin as a loading control. The graphs represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and are expressed as the fold of migration above the control value. Asterisks indicate comparisons made to control. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 2.** Resistin increases PC3 cell invasiveness by upregulating MMP-2 and MMP-9 secretion. (A) PC3 cells were treated for 48 h with resistin, at which time a conditioned medium was obtained and processed through zymography to evaluate MMP-2 and MMP-9 secretion; (B) Boyden chamber method was used to evaluate PC3 cell invasion. Cells were seeded in the upper chamber precoated with Matrigel, and treatment with resistin was added to the lower chamber. After 48 h, cell invasion was analyzed. The graph represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and is expressed as the fold of invasion above the control value. \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

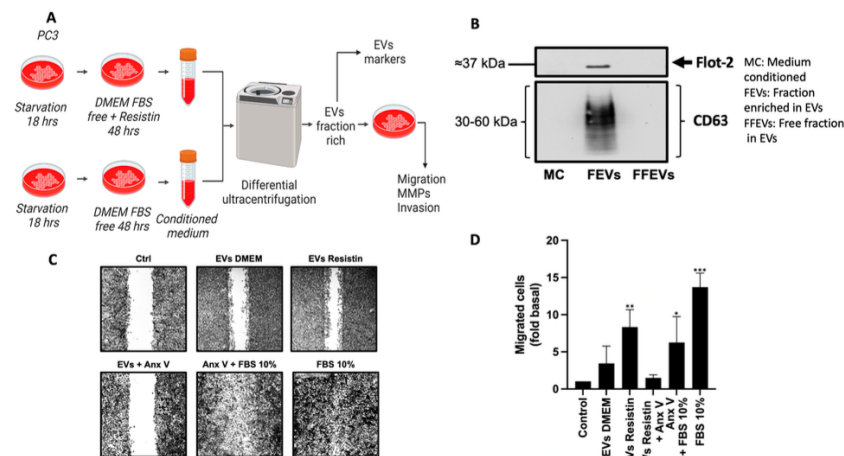


**Figure 3.** Resistin promotes an increase in the area of spheroids in PC3 cells. (A) 24-well plates were coated with 400  $\mu$ L of 1.5% agarose. Subsequently, about  $1 \times 10^5$  PC3 cells were placed per well/condition, which were treated with 5% FBS alone or with 5% FBS + resistin (25 ng/mL) for seven days. During the assay, follow-up was maintained by taking photos of the spheroids on days 3, 5, and 7. Finally, the spheroidal area was analyzed with the ImageJ software. (B) The graph represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and is expressed as spheroid area ( $\text{mm}^2$ ). The scale bar is equal to 1 mm. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

#### 3.4. Resistin Induces the Secretion of EVs That Promote PC3 Cell Migration

EVs are vesicles that contain multiple cargo molecules, which are determined according to the cell type secreting the EVs and the particular signals to which the cell is exposed [29,30]. Multiple factors, such as physical signals, hypoxia, low glucose levels, cytokines, and growth factors, induce EV secretion. Therefore, we decided to analyze whether resistin modulates the function of EVs in PC3 cells. First, we obtained a fraction enriched in EVs by differential centrifugation, according to the strategy schematized in Figure 4A. To verify that the EV fractions were properly obtained, they were processed by Western blotting using anti-CD63

and anti-flotillin-2 antibodies since these proteins are considered EV markers. The results show that we obtained an EVs fraction positive for flotillin-2 and CD63, indicating that these fractions are enriched in EVs (Figure 4B). EVs have been involved in tumor progression, participating in the modulation of the tumor microenvironment and favoring tumor growth, proliferation, migration, and invasion. However, the role of resistin in EV secretion remains to be studied. Thus, we decided to evaluate the effect of resistin on the secretion of EVs. PC3 cultures were treated without or with resistin for 48 h, a conditioned medium was obtained, and EV fractions were isolated (Figure 4A). We decided to study whether the EV fractions from PC3 cells treated with resistin regulate cell migration. Our data indicate that EVs derived from resistin-treated PC3 cells induce an increase in PC3 cell migration compared to migration promoted by EVs from PC3 cells not stimulated with resistin (Figure 4C). In this assay, we included control of uptake inhibition with EVs pre-treated with annexin V [31–33], a protein that binds to phosphatidylserine on EVs and regulates uptake. This indicates that EVs stimulate cell migration.

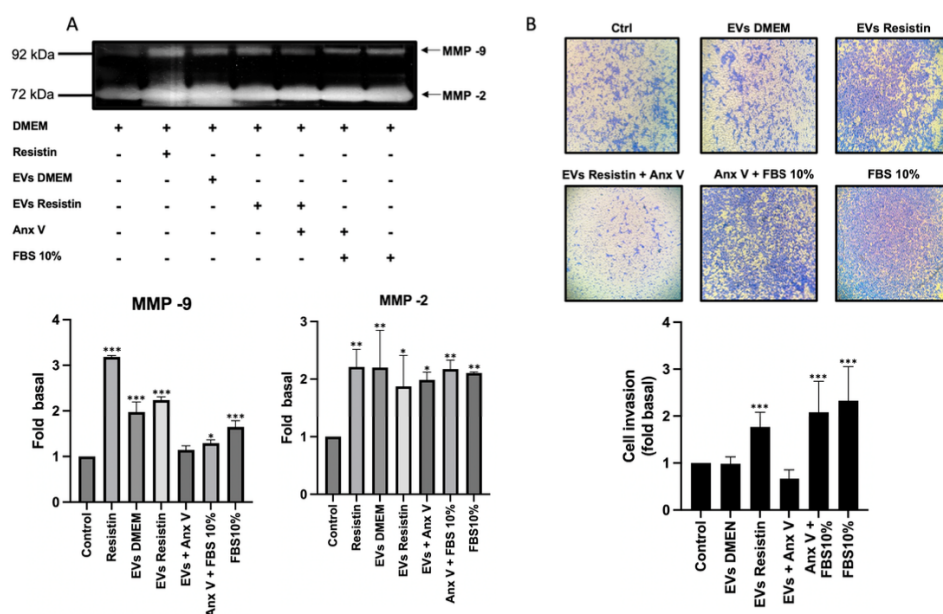


**Figure 4.** EVs derived from resistin-treated PC3 cells induce cell migration in PC3 cells. (A) Differential ultracentrifugation was used to isolate a fraction enriched with EVs. (B) EVs fraction was processed by Western blot assay using anti-flotillin-2 and anti-CD63 as EV markers; (C) cell migration was evaluated through scratch wound assay. Cells were treated with EVs derived from resistin-treated PC3 cells or without resistin treatment (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per condition). After 48 h, the migration of cells was analyzed. (D) Graphs are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and are expressed as the fold value of migrated cells above the control value. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.5. EVs Derived from Resistin Treatment Induce Cell Invasion

MMP-2 and MMP-9 are involved in the remodeling process of the extracellular matrix, increasing its secretion during invasion and tumor metastasis. Therefore, we determined whether EVs from PC3 cells regulate the secretion of MMPs. PC3 cultures were treated for 48 h with EVs isolated from the supernatant of PC3 cells treated with or without resistin. Subsequently, the supernatants were collected and analyzed by zymography. Consistent with our previous data, resistin induces the secretion of MMP-2 and MMP-9 compared to the control group (Figure 5A). In addition, treatment of PC3 cells with DMEM EVs induces the secretion of MMP-2 and MMP-9 to a lesser extent. Interestingly, treating PC3 cells with resistin EVs promotes the secretion of MMP-2 and MMP-9 without reaching the levels of DMEM EVs. We included EVs pre-incubated with annexin V, which significantly decreased the secretion of MMP-9 into the conditioned medium without affecting MMP-2

levels (Figure 5A). We decided to evaluate the EVs by zymography. Our data suggest that EVs carry MMP-9, with a slight increase in the EVs resistin fraction; while MMP-2 is not detectable in both fractions. As controls we added the conditioned medium and the free fraction of EVs. These data suggest that MMP-9 is an cargo enzyme in PC3 cell-derived EVs (Figure S2). Since the secretion of MMPs in the extracellular space is strongly associated with cancer invasion, we decided to evaluate the impact of EVs isolated from PC3 cells on cell invasion by Boyden chamber assays. The inserts were coated with Matrigel, placing PC3 cells on this extracellular matrix surface. In the lower chamber, EVs isolated from PC3 cells treated or not with resistin were placed. As shown in Figure 5B, EVs isolated from resistin-treated PC3 cells induce a significant increase in cell invasion compared to PC3 cells stimulated with EVs isolated from PC3 cells without resistin treatment or DMEM alone (control group).



**Figure 5.** EVs derived from resistin-treated PC3 cells induce cell invasion in PC3 in an autocrine way. (A) PC3 cells were treated for 48 h with EVs derived from resistin-treated PC3 cells or without resistin treatment. Supernatants were collected and analyzed by zymography to evaluate MMP-2 and MMP-9 secretion; (B) Boyden chamber method was used to evaluate PC3 cell invasion when stimulated with EVs derived from resistin-treated PC3 cells or without resistin treatment. Cells were seeded in the upper chamber precoated with Matrigel, and treatment with EVs was added to the lower chamber. After 48 h, cell invasion was analyzed. The graph represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and is expressed as the fold of invasion above the control value. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4. Discussion

Resistin is an adipokine involved in metabolic and inflammatory processes. Studies have indicated a relationship between high levels of circulating resistin with overweight and obesity. These conditions are associated with the development of diabetes, hypertension, dyslipidemia, metabolic syndrome, and an increased risk of cancer [34,35]. There is evidence that resistin increases aggressiveness in breast cancer, favoring processes such as tumor growth by increasing BCL-2 and BCL-xL activity, accompanied by a decrease

in cleaved caspase-7 and -3. Interestingly, resistin promotes breast cancer metastasis by increasing Src activity and phosphorylation and favoring PKC $\alpha$  translocation to the nucleus [36]. Resistin has been linked to tumor progression in patients with prostate cancer. In a study in which Korean patients participated, it was observed that as the Gleason score increased, there was an increase in the expression of resistin in prostate tumor tissue. This was accompanied by an increase in the proliferation and phosphorylation of Akt in the prostate cancer cell lines PC3 and DU-145 [15]. Therefore, we decided to evaluate whether resistin impacts other cellular processes associated with prostatic cancer progression. Here, we show that resistin induces an increase in migration and invasion in PC3 cells, concomitant with an increase in the secretion of MMP-2 and MMP-9 and high levels of FAK phosphorylation (Tyr-397) [15,35]. FAK overexpression (and high phosphorylation levels) is associated with increased tumor aggressiveness in processes such as migration, invasion, and metastasis [37–39]. It has been shown that the phosphorylation of FAK at its Tyr-397 residue is related to its maximum catalytic activity, activating proteins such as PI3K, Src, Grb7, and N-WASP [40,41]. Resulting in a high migratory and invasive capacity in cancer cells [41].

The secretion of MMP-2 and MMP-9 by cancer cells is an important mechanism of the cell invasion process since these enzymes degrade basal membrane components such as type IV collagen, a process associated with highly invasive and metastatic tumors [24]. The secretion of MMPs can be induced by the activation of the PI3K/Akt pathway, which leads to the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. The transcription factor NF $\kappa$ B regulates the expression of multiple proteins that modulate cell invasion, among which are Snail1 and 2, Twist1 and 2, vimentin, MMP-9, and MT1-MMP, which induces the activation of MMP-2 [24,25]. Our group confirmed that exposure of PC3 cells to resistin increases the secretion level of MMP-2 and MMP-9 in the conditioned medium, favoring invasion in prostate cancer cells.

EVs are involved in cellular communication processes as well as physiological processes. EVs contain in their membrane phospholipids, transmembrane proteins, and proteins that are components of lipid rafts. At the same time, inside the EVs, there are various intracellular proteins, second messengers, and genetic material that can be packaged in the EVs [42,43]. As a consequence, the properties and biological role of EVs may differ depending on the parent cell and the microenvironment to which they are exposed. EVs can fuse with the plasma membrane of target cells, transferring genetic information, second messengers, and receptors that can induce cell signaling, whereby the recipient cell acquires new functions [42,43]. The secretion of EVs by cancer cells represents a mechanism by which bioactive molecules such as nucleic acids, chemokine receptors, growth factor receptors, functional transcription factors, enzymes, and various intracellular proteins that modulate signaling pathways are transferred. In addition, EVs are secreted in response to a wide variety of stimuli, released at high concentrations by cancer cells. Thus, we hypothesized that resistin could regulate cell–cell communication mediated by EVs in the PC3 cells. Our results indicate that resistin induces the secretion of EVs that promote migration and invasion in PC3 cells, simulating a model of autocrine communication. Resistin-mediated EVs secretion can be supported by the fact that, in MDA-MB-231 invasive mammary cancer cells, resistin promotes an increase in intracellular calcium concentration, a phenomenon known to induce EV secretion [42,43]. EVs contain a variety of cargo molecules that promote invasion and metastasis, including PI3K/AKT,  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin, EGFRvIII, and a wide variety of miRNAs [36,37]. This strongly suggests that resistin-exposed PC3 cells secrete EVs with cargo molecules that induce invasion and metastasis, highlighting the importance of resistin in prostatic tumor progression. However, further assays are required to support these events. Our data indicate that the EVs-enriched fraction presents Flot-2 and CD63; however, it is necessary to characterize the EVs populations by electron microscopy and/or nanoparticle tracking analysis.

Resistin is a protein secreted by cells such as macrophages, and it regulates the inflammatory response by promoting the secretion of TNF-alpha and IL-12 in macrophages [44]. These

effects could be induced by their possible interaction with and activation of TLR4 [42,45]. It has been observed that the activation of TLR4 generates an increase in calcium release [46,47] from the endoplasmic reticulum to the cytoplasm (intracellular calcium). In cancer cells, resistin promotes phosphorylation of Src (a downstream target of FAK kinase) and increases intracellular calcium levels [42]. It has been shown that the FAK/Src pathway induces Akt activation in cancer cells. This results in increased secretion of MMP-2 and MMP-9, favoring proliferation, migration, invasion, and metastasis [48]. Particularly, an increase in intracellular calcium levels is a key event in microvesicle and exosome biogenesis and secretion by tumor cells [43]. In line with this notion, we hypothesize that, in PC3 cells, resistin interacts with and activates TLR4, increasing p-FAK and intracellular calcium levels. FAK activation promotes the phosphorylation of p-Src and the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway, which increases the secretion of MMP-2 and MMP-9, favoring proliferation, migration, and invasion in PC3 cells. Furthermore, the increase in intracellular calcium levels generates an increase in the EV biogenesis and secretion of cargo molecules that induce the invasion process of PC3 cells.

In summary, our data show for the first time that resistin triggers invasion in PC3 cells. In addition, PC3 cells exposed to resistin secrete EVs that induce migration and invasion in PC3 cells. This highlights resistin as an important adipokine in prostate cancer progression and metastasis.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life13122321/s1>, Figure S1: Effect of resistin and mitomycin C on the proliferation of PC3 cells. Cell proliferation was evaluated at 48 h using the MTT assay. Figure S2: Analysis of EVs fractions by zymography. Protein levels in EVs were quantified by micro-Bradford protein assay. In each condition, 25  $\mu$ g of protein were analyzed. Figure S3: The effect of resistin EVs on migration is dependent on protein levels. Cell migration was evaluated through scratch-wound assay. Cells were treated with different protein levels from EVs fraction (30, 60 and 100  $\mu$ g/mL) and migration of cells was analyzed after 48 h.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.G.-H.; data curation, M.I.O.-C.; formal analysis, M.I.O.-C. and G.Q.-G.; funding acquisition, O.G.-H.; investigation, M.I.O.-C. and V.G.-G.; methodology, M.I.O.-C. and H.F.-G.; project administration, O.G.-H.; resources, O.G.-H.; software, J.G.V.-J.; supervision, O.G.-H.; validation, J.G.V.-J.; writing—original draft, M.I.O.-C., G.Q.-G. and O.G.-H.; writing—review and editing, M.I.O.-C., H.F.-G., G.Q.-G., V.G.-G., J.G.V.-J. and O.G.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the 22nd Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación (Internal Call for Research Projects, grant number 106/2/C/33/22) from the Universidad Autónoma de Baja California (UABC) and partially by the Convocatoria 2019 Apoyos para Adquisición y Mantenimiento de Infraestructura en Instituciones y Laboratorios de Investigación Especializada (CONAHCYT, grant number 300015).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data obtained throughout the experiments can be provided by O.G.-H. upon reasonable request.

**Acknowledgments:** The first author thanks the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) of Mexico for the Ph.D. scholarship. We gratefully acknowledge the Universidad Autónoma de Baja California for the funding provided to carry out this project.

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

## References

1. Murillo-Garzon, V.; Kypta, R. WNT signalling in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2017**, *14*, 683–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ku, S.Y.; Gleave, M.E.; Beltran, H. Towards precision oncology in advanced prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2019**, *16*, 645–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wu, D.; Ni, J.; Beretov, J.; Cozzi, P.; Willcox, M.; Wasinger, V.; Walsh, B.; Graham, P.; Li, Y. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2017**, *118*, 15–26. [[CrossRef](#)]

4. Sonpavde, G. The biology of prostate cancer metastases: Does oligo differ from polymetastatic? *Curr. Opin. Urol.* **2017**, *27*, 542–546. [[CrossRef](#)]
5. Pernar, C.H.; Ebot, E.M.; Wilson, K.M.; Mucci, L.A. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a030361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kothari, C.; Diorio, C.; Durocher, F. The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5760. [[CrossRef](#)]
7. Unamuno, X.; Gomez-Ambrosi, J.; Rodriguez, A.; Becerril, S.; Fruhbeck, G.; Catalan, V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48*, e12997. [[CrossRef](#)]
8. Tripathi, D.; Kant, S.; Pandey, S.; Ehtesham, N.Z. Resistin in metabolism, inflammation, and disease. *FEBS J.* **2020**, *287*, 3141–3149. [[CrossRef](#)]
9. Avgerinos, K.I.; Spyrou, N.; Mantzoros, C.S.; Dalamaga, M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism* **2019**, *92*, 121–135. [[CrossRef](#)]
10. Kwakwa, K.A.; Sterling, J.A. Integrin alphavbeta3 Signaling in Tumor-Induced Bone Disease. *Cancers* **2017**, *9*, 84. [[CrossRef](#)]
11. Cancel, M.; Pouillot, W.; Maheo, K.; Fontaine, A.; Crottes, D.; Fromont, G. Interplay between Prostate Cancer and Adipose Microenvironment: A Complex and Flexible Scenario. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ahmad, A.E.; Mohammed, A.; Bhindi, B.; Richard, P.O.; Fadaak, K.; Leao, R.; Finelli, A.; Fleshner, N.E.; Kulkarni, G.S. Serum Adipokines as Predictors for the Outcome of Prostate Biopsies at Early Stage Prostate Cancer Diagnosis. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 10043–10050. [[CrossRef](#)]
13. Codoner-Franch, P.; Alonso-Iglesias, E. Resistin: Insulin resistance to malignancy. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *438*, 46–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Booth, A.; Magnuson, A.; Fouts, J.; Foster, M. Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2015**, *21*, 57–74. [[CrossRef](#)]
15. Kim, H.J.; Lee, Y.S.; Won, E.H.; Chang, I.H.; Kim, T.H.; Park, E.S.; Kim, M.K.; Kim, W.; Myung, S.C. Expression of resistin in the prostate and its stimulatory effect on prostate cancer cell proliferation. *BJU Int.* **2011**, *108*, E77–E83. [[CrossRef](#)]
16. Tapial Martinez, P.; Lopez Navajas, P.; Lietha, D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules* **2020**, *10*, 179. [[CrossRef](#)]
17. Karmakar, D.; Maity, J.; Mondal, P.; Shyam Chowdhury, P.; Sikdar, N.; Karmakar, P.; Das, C.; Sengupta, S. E2F5 promotes prostate cancer cell migration and invasion through regulation of TFFI2, MMP-2 and MMP-9. *Carcinogenesis* **2020**, *41*, 1767–1780. [[CrossRef](#)]
18. Taghizadeh, S.; Soheili, Z.S.; Sadeghi, M.; Samiei, S.; Ranaei Pirmardan, E.; Kashanian, A.; Zakeri, F.; Latifi-Navid, H.; Shams Najafabadi, H. sFLT01 modulates invasion and metastasis in prostate cancer DU145 cells by inhibition of VEGF/GRP78/MMP2&9 axis. *BMC Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 30. [[CrossRef](#)]
19. Bebelman, M.P.; Smit, M.J.; Pegtel, D.M.; Baglio, S.R. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *188*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ortiz, A. Extracellular vesicles in cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* **2021**, *76*, 139–142. [[CrossRef](#)]
21. Galindo-Hernandez, O.; Serna-Marquez, N.; Castillo-Sanchez, R.; Salazar, E.P. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2014**, *91*, 299–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chhoy, P.; Brown, C.W.; Amante, J.J.; Mercurio, A.M. Protocol for the separation of extracellular vesicles by ultracentrifugation in vitro cell culture models. *STAR Protoc.* **2021**, *2*, 100303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Livshits, M.A.; Khomyakova, E.; Evtushenko, E.G.; Lazarev, V.N.; Kulemin, N.A.; Semina, S.E.; Generozov, E.V.; Govorun, V.M. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17319. [[CrossRef](#)]
24. Saraiva, D.P.; Matias, A.T.; Braga, S.; Jacinto, A.; Cabral, M.G. Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient-Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chung, W.H.; Kim, T.H.; Chang, I.H.; Myung, S.C. Relation of Resistin to Prostate Cancer Differentiation and Aggressiveness. *Korean J. Urol.* **2009**, *50*, 540–546. [[CrossRef](#)]
26. Sulzmaier, F.J.; Jean, C.; Schlaepfer, D.D. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 598–610. [[CrossRef](#)]
27. Klein, G.; Vellenga, E.; Fraaije, M.W.; Kamps, W.A.; de Bont, E.S. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g., acute leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2004**, *50*, 87–100. [[CrossRef](#)]
28. Xiao, L.J.; Lin, P.; Lin, F.; Liu, X.; Qin, W.; Zou, H.F.; Guo, L.; Liu, W.; Wang, S.J.; Yu, X.G. ADAM17 targets MMP-2 and MMP-9 via EGFR-MEK-ERK pathway activation to promote prostate cancer cell invasion. *Int. J. Oncol.* **2012**, *40*, 1714–1724. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, L.; Yu, D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2019**, *1871*, 455–468. [[CrossRef](#)]
30. Bebelman, M.P.; Janssen, E.; Pegtel, D.M.; Crudden, C. The forces driving cancer extracellular vesicle secretion. *Neoplasia* **2021**, *23*, 149–157. [[CrossRef](#)]

31. Catalano, M.; O'Driscoll, L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: A review of EV inhibitors. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1703244. [[CrossRef](#)]
32. Galindo-Hernandez, O.; Gonzales-Vazquez, C.; Cortes-Reynosa, P.; Reyes-Uribe, E.; Chavez-Ocana, S.; Reyes-Hernandez, O.; Sierra-Martinez, M.; Salazar, E.P. Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol.* **2015**, *36*, 9649–9659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Arraud, N.; Gounou, C.; Linares, R.; Brisson, A.R. A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13*, 237–247. [[CrossRef](#)]
34. Acquarone, E.; Monacelli, F.; Borghi, R.; Nencioni, A.; Odetti, P. Resistin: A reappraisal. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *178*, 46–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lazar, M.A. Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm. Metab. Res.* **2007**, *39*, 710–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wang, Y.Y.; Hung, A.C.; Lo, S.; Yuan, S.F. Adipocytokines visfatin and resistin in breast cancer: Clinical relevance, biological mechanisms, and therapeutic potential. *Cancer Lett.* **2021**, *498*, 229–239. [[CrossRef](#)]
37. Guarino, M. Src signaling in cancer invasion. *J. Cell Physiol.* **2010**, *223*, 14–26. [[CrossRef](#)]
38. Zhou, J.; Yi, Q.; Tang, L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: A focused review. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 250. [[CrossRef](#)]
39. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every step of the way: Integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548. [[CrossRef](#)]
40. Mitra, S.K.; Schlaepfer, D.D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 516–523. [[CrossRef](#)]
41. Zhao, X.; Guan, J.L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 610–615. [[CrossRef](#)]
42. Lee, J.O.; Kim, N.; Lee, H.J.; Lee, Y.W.; Kim, S.J.; Park, S.H.; Kim, H.S. Resistin, a fat-derived secretory factor, promotes metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells through ERM activation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Taylor, J.; Azimi, I.; Monteith, G.; Bebawy, M. Ca<sup>2+</sup> mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1734326. [[CrossRef](#)]
44. Silswal, N.; Singh, A.K.; Aruna, B.; Mukhopadhyay, S.; Ghosh, S.; Ehtesham, N.Z. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1092–1101. [[CrossRef](#)]
45. Wang, C.H.; Wang, P.J.; Hsieh, Y.C.; Lo, S.; Lee, Y.C.; Chen, Y.C.; Tsai, C.H.; Chiu, W.C.; Chu-Sung Hu, S.; Lu, C.W.; et al. Resistin facilitates breast cancer progression via TLR4-mediated induction of mesenchymal phenotypes and stemness properties. *Oncogene* **2018**, *37*, 589–600. [[CrossRef](#)]
46. Tauseef, M.; Knezevic, N.; Chava, K.R.; Smith, M.; Sukriti, S.; Gianaris, N.; Obukhov, A.G.; Vogel, S.M.; Schraufnagel, D.E.; Dietrich, A.; et al. TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 1953–1968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chiang, C.Y.; Veckman, V.; Limmer, K.; David, M. Phospholipase Cgamma-2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3704–3709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Jing, Y.; Liang, W.; Liu, J.; Zhang, L.; Wei, J.; Zhu, Y.; Yang, J.; Ji, K.; Zhang, Y.; Huang, Z. Stress-induced phosphoprotein 1 promotes pancreatic cancer progression through activation of the FAK/AKT/MMP signaling axis. *Pathol. Res. Pract.* **2019**, *215*, 152564. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.