

1 Metodología de elaboración

Revisión de artículos obtenidos en **PubMed**

Búsqueda de materiales en casas comerciales como **ThermoFisher**

1º Hipótesis y objetivos. → 2º Diseño experimental. → 3º Definición de la estructura. → 4º Redacción y presupuesto.

Palabras Clave: *Exosome, Prostate Cancer, ELISA, FOLH1, FABP5, Urine, Biomarker, CA-IX.*

2 Introducción

• El **cáncer de próstata (PCa)** es el más diagnosticado en hombres, sin embargo, su sistema de diagnóstico actual (PSA) es inespecífico y desemboca en biopsias y tratamientos innecesarios.

• Los **exosomas** son nano-vesículas (40-100 nm) producidas de manera habitual por las células que se encuentran en los fluidos biológicos (obtención no invasiva) y que contienen todo tipo de biomoléculas tanto en su interior como en su membrana.

• La **detección de biomarcadores** específicos entre las moléculas presentes en **exosomas aislados de orina** y su detección son una técnica de **diagnóstico precoz** muy prometedora.

Biomarcadores seleccionados:

- 1. PSMA**, también "folato hidrolasa I" por su función enzimática, presenta una muy elevada expresión de forma específica en cáncer de próstata, también a nivel exosomal.
- 2. FABP5**, es una proteína transportadora de lípidos, no se expresa prácticamente en tejido prostático sano, se sobreexpresa en exosomas de pacientes con cáncer de próstata y se relaciona con el Gleason score (valor pronóstico).
- 3. CA IX**, es una enzima membranar relacionada con el control del pH y del transporte de iones. Es la anhidrasa carbónica más específica de tumores sólidos y se detectó en exosomas 25 veces más elevada en cáncer de próstata.

3 Hipótesis y objetivos

El uso de exosomas como biomarcador múltiple mejora el proceso de diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata además de hacerlo más rápido y menos invasivo.

Objetivo 1: **Obtener y caracterizar los exosomas** de líneas celulares.

Objetivo 2: **Poner a punto el ELISA** a partir de muestras de exosomas de LC.

Objetivo 3: **Validar el ELISA** a partir de **muestras de orina** de pacientes.

4 Esquema del proyecto

Objetivo 1 Obtener y caracterizar exosomas de LC.

Tarea 1: Cultivo de líneas celulares (LC).
LNCaP, MDA-Pca-2b, DU145, PC3

Tarea 2: Recolección de muestras de pacientes.
BPH=hiperplasia prostática benigna (control sano) / PCa=cáncer de próstata

Tarea 3: Ultracentrifugación (UC).
Obtención de exosomas purificados de LC y orina.

Ex. de LC
Matriz + Ex.

Tarea 4: Caracterización de los exosomas de líneas celulares.

Fase previa al aislamiento de exosomas (NTA + SEM).

Nanoparticle tracking análisis (NTA)
Distribución de tamaños y concentración de exosomas

Microscopía electrónica de barrido (SEM)
Morfología de los exosomas.

Fase de aislamiento y posterior análisis (FlowCyt + WB).

Aislamiento de exosomas con MP. → Citometría de flujo y Western Blot.

4 tipos de partículas magnéticas (MP) para aislar exosomas.

- **MP9 y MP81:** tetraspaninas, proteínas membranales presentes en exosomas.
- **EpCAM:** marcador epitelial.
- **MP+grupo tosyl:** unen los exosomas de forma covalente.

MP+CD9, MP+CD81, MP+ tosyl, MP+EpCAM

Cuantificación de exosomas positivos para los biomarcadores (**PSMA, CA IX y FABP5**) y confirmación de la expresión por Western Blot.

Objetivo 2 Poner a punto el ELISA con LC.

Tarea 5: ELISA con muestras UC de líneas celulares.

Muestras UC y sus sucesivas diluciones (LOD)

MP + CD9, MP + CD81, MP + EpCAM, MP + tosyl

Ac para FABP5, PSMA o CA-IX
Ac 2º con peroxidasa

ELISA sobre MPs, ELISA en placa

Tarea 6: Evaluación del efecto matriz (en placa y en partículas magnéticas).

Análisis 1 Matriz, Análisis 2 Matriz BPH Matriz PCa, + Controles en placa

Pruebas con las cinco mejores combinaciones MP + biomarcador de la tarea 5 (matriz limitada).

Objetivo 3 Validar en pacientes.

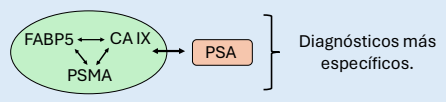
Tarea 7: Análisis por ELISA de las muestras de pacientes.

Evaluación en pacientes usando la combinación MP + biomarcador con mejores resultados del objetivo anterior.

Control Sano BPH, Cáncer Próstata, + control UC

5 Resultados Esperados

- Se esperan **mejores resultados de PSMA** (mayor respaldo bibliográfico).
- Mínimo **1/3 marcadores** { Efecto matriz ↓ 15%, Límite de Detección ↓ 10⁵ exosomas/µL }
- La **combinación de los biomarcadores** para mejorar diagnósticos haciéndolos más específicos.



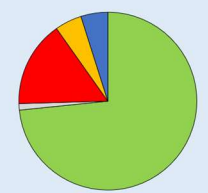
6 Plan de contingencia

Supuesto 1. **Interferencia excesiva de matriz:**
Combinar con **cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)** para eliminar interferentes de orina. Ej. ExoSpin

Supuesto 2. **Concentración exosomal insuficiente:**
Lisis de exosomas → amplificación de mRNA → detección rtPCR.

8 Presupuesto

Presupuesto total aproximado de **102.000€**



- Desglose**
- Personal 75.000€
 - Fungibles 16.000€
 - Análisis 1.200€
 - Publicaciones 5000€
 - Congresos 5000€

7 Plan de Difusión

Atender a **congresos y simposios** sobre cáncer de próstata.

Contactar a **asociaciones de pacientes, podcast, radio...** → llegar al público general.

Presentación de los resultados a **revistas científicas.**

EAU24 PARIS, FRANCE 5-8 April 2024, Mirrors of medicine, ISSECM, AEOPCaP, THE JOURNAL of UROLOGY, ANNALS of ONCOLOGY