

Ardura JA^{1,2}, Gutiérrez Rojas I¹, Álvarez Carrión L¹, Friedman PA³, Alonso V^{1,2}

1 Laboratorio de Fisiopatología Ósea - Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) - Universidad San Pablo-CEU - Madrid (España)

2 Departamento de Ciencias Médicas Básicas - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo-CEU - Madrid (España)

3 Departamento de Farmacología y Biología Química - Universidad de Pittsburgh - Pensilvania (Estados Unidos)

Factores secretados por células óseas inducen acumulación de calcio intracelular y AMP cíclico y activación de ERK 1/2 en células de cáncer de próstata; evaluación por técnicas de fluorescencia en células vivas

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000400005>

Correspondencia: Verónica Alonso Rodríguez - Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo-CEU - 28925 Alcorcón - Madrid (España)

Correo electrónico: veronica.alonsorodriguez@ceu.es

Fecha de recepción: 05/07/2018

Fecha de aceptación: 18/11/2018

Trabajo becado para asistir al 39º Congreso de la ASBMR (Denver, 2017).

Resumen

Objetivos: Analizar en células tumorales de próstata los efectos causados por el secretoma de células óseas sobre la proliferación y sobre vías de señalización intracelular relacionadas con la progresión del cáncer de próstata.

Materiales y métodos: Se caracterizaron los efectos de factores secretados presentes en medios condicionados de pre-osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 sobre la proliferación de células de adenocarcinoma de próstata metastásicas PC-3 mediante tinción por azul de tripano. Se observó por técnicas de fluorescencia en células vivas los efectos de los medios condicionados por células MC3T3-E1 y MLO-Y4 en moléculas de señalización intracelular implicadas en la progresión tumoral de células de adenocarcinoma de próstata PC-3. Se estudió la acumulación de calcio intracelular utilizando el indicador de calcio fluorescente Fluo-4AM y la generación de AMP cíclico, y la activación de la quinasa ERK 1/2 por Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET) usando los biosensores EPAC y ERK-NES, respectivamente.

Resultados: La estimulación de células PC-3 con medios condicionados de pre-osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 indujo aumento en la proliferación de las células de adenocarcinoma PC-3. Los medios condicionados por células óseas causaron también aumento transitorio en la acumulación de calcio intracelular y de la generación de AMP cíclico e incrementaron la activación de la quinasa ERK 1/2.

Conclusiones: Las células óseas secretan factores activadores de la proliferación y de vías de señalización que favorecen la progresión tumoral de células de cáncer de próstata, sugiriendo que la comunicación cruzada entre estos tipos celulares puede favorecer el desarrollo de nichos metastásicos de cáncer de próstata en el hueso.

Palabras clave: *cáncer de próstata, factores secretados óseos, señalización intracelular, fluorescencia en células vivas, calcio, AMP cíclico, ERK 1/2.*

Factors secreted by bone cells induce intracellular calcium accumulation and cyclic AMP and activation of ERK 1/2 in prostate cancer cells; evaluation by fluorescence techniques in living cells

Summary

Objectives: To analyze in prostate tumor cells the effects caused by the secretome of bone cells on proliferation and on intracellular signaling pathways related to the progression of prostate cancer.

Materials and methods: The effects of secreted factors present in conditioned media of pre-osteoblasts MC3T3-E1 and osteocytes MLO-Y4 on the proliferation of metastatic prostate adenocarcinoma cells PC-3 were characterized using trypan blue staining. The effects of media conditioned by MC3T3-E1 and MLO-Y4 cells on intracellular signaling molecules involved in the tumor progression of prostate adenocarcinoma cells PC-3 were observed by fluorescence techniques in living cells. The accumulation of intracellular calcium was studied using the fluorescent calcium indicator Fluo-4AM and the generation of cyclic AMP, and ERK 1/2 activation by Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) using the EPAC and ERK-NES biosensors, respectively.

Results: The stimulation of PC-3 cells with conditioned media of pre-osteoblasts MC3T3-E1 and osteocytes MLO-Y4 induced an increase in PC-3 adenocarcinoma cell proliferation. Media conditioned by bone cells also caused a transient increase in intracellular calcium accumulation and generation of cyclic AMP and increased ERK 1/2 activation.

Conclusions: Bone cells secrete proliferation-activating factors and signaling pathways that favor the tumor progression of prostate cancer cells, suggesting that cross-communication between these cell types may favor the development of metastatic niches of prostate cancer in the bone.

Key words: prostate cancer, secreted bone factors, intracellular signaling, fluorescence in living cells, calcium, cyclic AMP, ERK 1/2.

Introducción

La metástasis a hueso es una complicación frecuente en fases avanzadas de pacientes con cáncer de próstata, uno de los cánceres con mayor mortalidad y morbilidad en países desarrollados¹. Evitar las distintas etapas necesarias para que la célula tumoral abandone el tumor primario, migre y se establezca en el microambiente óseo es una de las principales estrategias para prevenir la diseminación de las metástasis óseas². La invasión de células de tumor primario a nichos esqueléticos se asocia con la activación de células óseas que liberan factores de crecimiento y citoquinas, que a su vez promueven el crecimiento del tumor en las metástasis. Como resultado se genera el denominado "ciclo vicioso" de las metástasis óseas, que varía la fisiología del hueso y altera el remodelado óseo^{3,4}. En el caso de las metástasis óseas causadas por cáncer de próstata se originan lesiones osteolíticas y osteoblásticas como resultado de la activación de osteoclastos y de osteoblastos respectivamente⁵. En procesos de metástasis ósea, se ha observado que las células tumorales son capaces de secretar factores como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 11 (IL-11), metaloproteasa de matriz 1 (MMP1), Jagged1 y proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), que activan directa o indirectamente osteoclastos, dando lugar a metástasis osteoclásticas⁶. La degradación de matriz por osteoclastos libera factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) que promueven la supervivencia de células tumorales⁷. En

contraste, la secreción por parte de células tumorales de otros factores como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) pueden estimular la diferenciación de osteoblastos resultando en lesiones osteoblásticas⁸.

Por otro lado, algunos estudios han descrito la importancia de segundos mensajeros y vías de señalización intracelular en la modulación de la proliferación, malignidad y capacidad metastásica de células tumorales. De este modo moléculas como el calcio, el adenosín monofosfato cíclico (AMP cíclico) o las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2), han sido propuestos como mediadores y posibles dianas terapéuticas en la progresión tumoral y la metástasis ósea⁹⁻¹¹.

A pesar de la existencia de diversas observaciones analizando los factores secretados por células tumorales que afectan a células óseas, existe escasa información sobre los factores secretados por osteoblastos y osteocitos que actúan sobre células tumorogénicas de próstata. En concreto, es poco conocido el efecto de factores secretados por células óseas sobre vías de señalización y segundos mensajeros relevantes en la mediación de procesos de progresión tumoral y metástasis a hueso en células tumorales de próstata.

En este estudio hemos usado técnicas de fluorescencia en células vivas para analizar si factores secretados por células óseas pueden modificar vías de señalización y segundos mensajeros en células de adenocarcinoma de próstata. Nuestras observaciones muestran que factores secretados por osteo-

blastos y osteocitos pueden inducir proliferación de células tumorales de próstata asociada a acumulación de AMP cíclico y calcio intracelulares y a la activación de la quinasa ERK. Estos resultados sugieren el papel clave de los factores óseos en mecanismos intracelulares relevantes para la progresión tumoral y la metástasis ósea.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Las células humanas de carcinoma prostático derivadas de metástasis óseas (PC-3, ATCC: CRL-1435) se cultivaron en RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). La línea celular preosteoblástica murina MC3T3-E1 (ATCC: CRL-2593) y osteocítica murina MLO-Y4 (generosamente donada por Lynda Bonewald) se cultivaron en DMEM con 10% de SFB o α -MEM con 2,5% de suero fetal de carnero (SCF) y 2,5% SFB, respectivamente. Todas las células fueron cultivadas en medios que contenían penicilina (100 unidades/mL) y estreptomina (100 μ g/mL) en un incubador humidificado a 37°C y 5% CO₂ atmosférico. Los medios condicionados fueron obtenidos de las células PC-3, MLO-Y4 o MC3T3-E1 cultivadas en α -MEM en ausencia de suero durante 24 h.

Transfecciones

Para transfecciones transitorias, las células PC-3 se cultivaron en cubreobjetos de cristal de 25 mm de diámetro durante 12 h previa a la transfección con FuGENE 6 (Roche Applied Science), que se realizó en medio de cultivo completo. Tras 24 h los cubreobjetos fueron transferidos en una cámara Attofluor (Invitrogen, Carlsbad, CA) con solución HEPES/albumina de suero bovino (ASB) (pH=7,4) (solución HEPES al 0,1% (p/v) ASB) para los experimentos de fluorescencia a tiempo real.

Ensayo de proliferación celular

El número de células viables PC-3 estimuladas con medios condicionados de células MC3T3-E1, MLO-Y4 o de las propias PC-3 fue evaluada por el ensayo de exclusión por azul de tripano como previamente ha sido descrito¹².

Medida del calcio intracelular

La acumulación de calcio intracelular fue cuantificada con el sensor sensible a calcio Fluo-4/AM (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo del fabricante como ha sido descrito previamente¹³. Brevemente, las células PC-3 fueron cultivadas en placas de cultivo MatTek con 2 μ M Fluo-4/AM en la solución salina equilibrada Hanks' (Invitrogen) a 22°C durante 45 min. Las células fueron lavadas tres veces en la solución Hanks' e incubada a 22°C durante 30 min. Las cuantificaciones de calcio intracelular fueron realizadas con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon A1s. Los niveles de fluorescencia fueron medidos a intervalos de 1 s hasta 20 min. Al menos 30-40 células se evaluaron bajo cada condición. Se utilizaron los reactivos ionomina (aumenta la entrada de iones de calcio en las células) 10 μ M y EGTA (quelante de calcio) 10 mM

para obtener el máximo y el mínimo de estimulación en cada célula analizada.

Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente (FRET): evaluación de AMP cíclico intracelular y fosforilación de ERK

Las células PC-3 fueron transfectadas transitoriamente con el biosensor de AMP cíclico EPAC¹⁴ o con el biosensor de fosforilación de ERK, ERK-NES¹⁵. La generación de AMP cíclico y la activación por fosforilación de ERK se evaluaron por Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente (FRET) como se describió previamente¹⁶. Las células se cultivaron en placas de cultivo Ibidi de 35 mm de diámetro y mantenidas en solución tampón FRET (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 0,1% albúmina de suero bovino, pH 7,4) donde se transfectaron transitoriamente con constructos constituidos por las proteínas de fusión: proteína fluorescente cian (CFP)-EPAC-proteína fluorescente amarillo (YFP) o por CFP-ERK-NES-YFP y que es activada por la unión directa de AMP cíclico o por fosforilación, respectivamente, experimentando cambios conformacionales que dan como resultado variaciones en las respuestas de FRET. Las cuantificaciones fueron realizadas en un microscopio Leica equipado con objetivo 40x de aceite de inmersión realizándose registros secuenciales de los canales de fluorescencia CFP e YFP. Las intensidades de la emisión de fluorescencia fueron determinadas a 535/15 nm (YFP) y 480/20 nm (CFP) con un paso largo dicróico (DCLP) de 505 nm. La señal de FRET se monitorizó como el índice de emisión de YFP (FYFP) y CFP (FCFP). Los resultados se muestran como la media normalizada (nFRET) \pm error estándar.

Análisis estadísticos

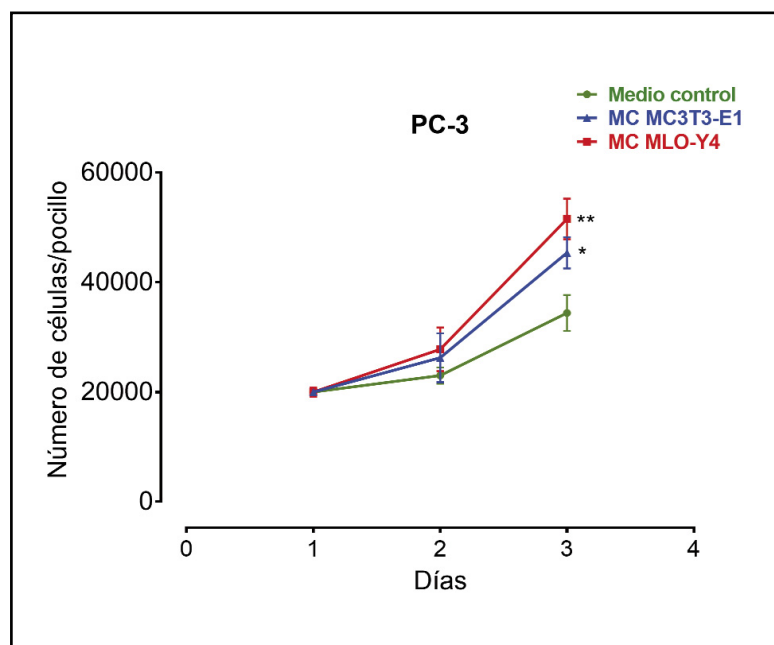
Los datos fueron expresados como media \pm error estándar. Las diferencias entre las condiciones experimentales y los controles fueron realizadas utilizando el test estadístico U Mann Whitney, en el que valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Resultados

Factores solubles de MC3T3-E1 y MLOY-4 inducen incremento de proliferación en las células de adenocarcinoma prostático humanas PC-3

Estudios previos sugieren que el entorno óseo favorece la estimulación de células de cáncer de próstata promoviendo el establecimiento de metástasis esqueléticas¹⁷. Para evaluar los efectos de factores secretados por células óseas sobre células de carcinoma de próstata, primero se analizaron las acciones de medios condicionados de osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 sobre la proliferación de células de cáncer de próstata PC-3. Se observó que tanto los medios condicionados de osteoblastos MC3T3-E1 como los de MLO-Y4 indujeron un aumento en la proliferación de células PC-3 tras 3 días de estimulación en comparación con medios condicionados control (de las propias células PC-3) (Figura 1).

Figura 1. Factores secretados por osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 aumentan la proliferación de células de carcinoma de próstata PC-3. Las células PC-3 se incubaron durante 1-3 días con medios condicionados (MC) obtenidos de MC3T3-E1 o MLO-Y4 y se evaluó el número de células mediante ensayo de azul de tripano. Los datos mostrados son medias \pm error estándar de 3 experimentos independientes * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. Medio condicionado (MC) Control



Factores solubles óseos osteoblásticos y osteocíticos inducen la formación de AMP cíclico y liberación de calcio intracelular en las células de adenocarcinoma prostático humanas PC-3

Seguidamente se estudiaron los efectos de los medios condicionados de células óseas en la activación de segundos mensajeros y vías de señalización relacionadas con la progresión tumoral, metástasis y la activación de respuestas osteogénicas^{9-11,18} mediante técnicas de fluorescencia en células vivas. Los medios condicionados de osteoblastos MC3T3-E1 y de osteocitos MLO-Y4 causaron un aumento rápido y transitorio en la concentración de calcio intracelular en las células de cáncer de próstata PC-3 comparado con la estimulación con medio condicionado por las propias células PC-3 (Figura 2A-C). De manera similar, la generación de AMP cíclico detectada mediante FRET fue estimulada por medios condicionados de osteoblastos y de osteocitos (Figura 3 A-C). Los niveles de AMC cíclico no variaron al estimular las células PC-3 con medios condicionados de PC-3 (datos no mostrados).

Activación de la vía de señalización ERK 1/2 en las células de adenocarcinoma prostático humanas PC-3 tras la estimulación de factores solubles óseos

La fosforilación de la quinasa ERK 1/2, una proteína directamente implicada en la proliferación de las células tumorales de próstata¹⁹, también fue inducida por medios condicionados de osteoblastos MC3T3-E1 y osteocitos MLO-Y4 (Figura 4A y B). El medio condicionado de células PC-3 por el

contrario, no causó cambios en la fosforilación de ERK 1/2 de las células PC-3 (Figura 4B).

Estos resultados en su conjunto muestran que los factores secretados por parte de células óseas modulan moléculas de señalización claves en procesos celulares como la proliferación de células tumorales de próstata.

Discusión

Nuestros resultados muestran que las células de adenocarcinoma prostáticas metastásicas aumentan su proliferación con factores secretados tanto por células osteoblásticas como osteocíticas. En el caso de las metástasis óseas, se ha hipotetizado que las células tumorales se establecen en zonas específicas de hueso como en el nicho endosteal, el nicho de células madre hematopoyéticas y el nicho vascular²⁰. Estos nichos son microambientes complejos en los que se secretan factores que promueven las funciones fisiológicas de las células que los componen. Se ha demostrado que al aumentar el número de estos nichos

experimentalmente también se incrementa el número de células tumorales diseminadas de tumores primarios²¹. Estas observaciones sugieren que los mismos factores que mantienen el correcto funcionamiento de las células de los nichos óseos son capaces a su vez de promover el establecimiento y crecimiento de células tumorales en las metástasis óseas. Desde este punto de vista, los osteoblastos y osteocitos localizados cerca de la superficie formarían parte del nicho endosteal y pueden generar factores promotores del crecimiento de células tumorales de próstata en este nicho.

Existen varios mecanismos que regulan el ciclo mitótico de células metastásicas en el hueso, incluyendo procesos reguladores del sistema inmune, de la angiogénesis, de la matriz extracelular, diversos factores y hormonas y procesos intracelulares²². Entre estos mecanismos se observó que el balance en la activación entre 2 quinasas proteicas activadas por mitógenos (MAP quinasas), p38 y ERK 1/2 afecta de manera clave a la mitosis de células tumorales metastásicas²³. Cuando ERK 1/2 se encuentra activado en comparación con p38, la proliferación celular se favorece, y por el contrario la activación de p38 frente a ERK 1/2 induce un estado quiescente celular²³. Nosotros hemos observado que los pre-osteoblastos y osteocitos pueden enviar factores solubles que activan a la quinasa ERK 1/2 en células PC-3 fomentando de este modo la proliferación de células tumorales.

Además, hemos observado que factores secretados al medio condicionado por pre-osteoblastos

y osteocitos también causaron aumento transitorio en la concentración de calcio intracelular y en la generación de AMP cíclico. Ambos segundos mensajeros pueden regular procesos de proliferación y metástasis tumoral y han sido propuestos como posibles dianas terapéuticas en varios cánceres^{9,10,24}. El AMP cíclico puede tener efectos positivos o negativos en el crecimiento y supervivencia de células tumorales dependiendo del tipo celular¹⁰. En tumores de origen epitelial como es el caso del cáncer de próstata, el AMP cíclico parece jugar un papel promotor de la oncogénesis mediante la activación de la proteína quinasa A y otras proteínas activadas a continuación (por ejemplo EPAC y CREB)^{25,26}.

Por otro lado, se ha demostrado que el aumento de la concentración de calcio intracelular de origen extracelular es un factor inductor de la proliferación de líneas celulares prostáticas de metástasis ósea (PC-3 y C4-2B), pero no afecta a la proliferación de líneas celulares prostáticas no metastásicas como las células LNCaP⁹. El aumento de la concentración de calcio de origen extracelular causa en PC-3 un aumento en la expresión de ciclina D1 (una proteína reguladora del ciclo celular necesaria en la proliferación), en la activación de Akt (proteína requerida para la proliferación y progresión tumoral)^{27,28}, y aumenta la capacidad de unión de células tumorales a sustrato⁹. Además, alteraciones en la expresión génica de diversos canales iónicos de calcio, como los TRP y Orai, se han asociado con aumentos de la entrada de calcio en las células tumorales de próstata que facilitan la proliferación y resistencia a apoptosis de dichas células^{29,30}.

Estos estudios en su conjunto muestran la función relevante de la activación de la quinasa ERK 1/2, del calcio y del AMP cíclico en la progresión del cáncer de próstata. Aunque la modulación de estas vías de señalización por parte de factores secretados por células óseas no ha sido descrita previamente, algunos estudios han demostrado la capacidad de las

Figura 2. Factores secretados por MC3T3-E1 y MLO-Y4 aumentan la señalización de calcio intracelular de PC-3. Se analizaron los efectos de factores secretados de medios condicionados obtenidos durante 24 horas de MC3T3-E1 (A), MLO-Y4 (B) o de PC-3 (C) en la liberación de calcio intracelular de PC-3. La evaluación de los niveles de calcio intracelular se realizó mediante fluorescencia confocal en células vivas con el indicador Fluo-4AM según se ha descrito en el texto. Las flechas indican el momento de estimulación con medios condicionados. Los datos mostrados son medias \pm error estándar de 3 experimentos independientes

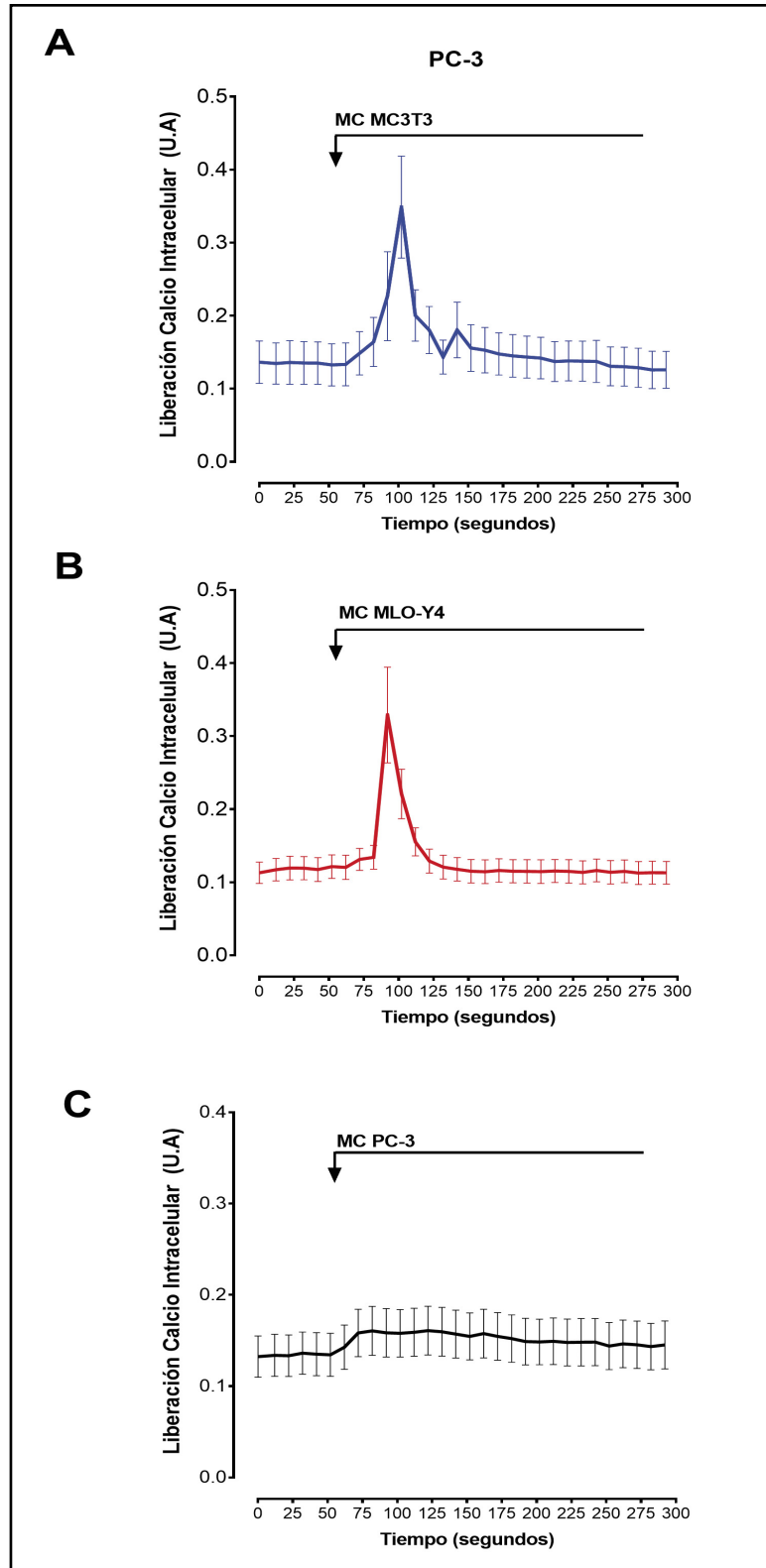
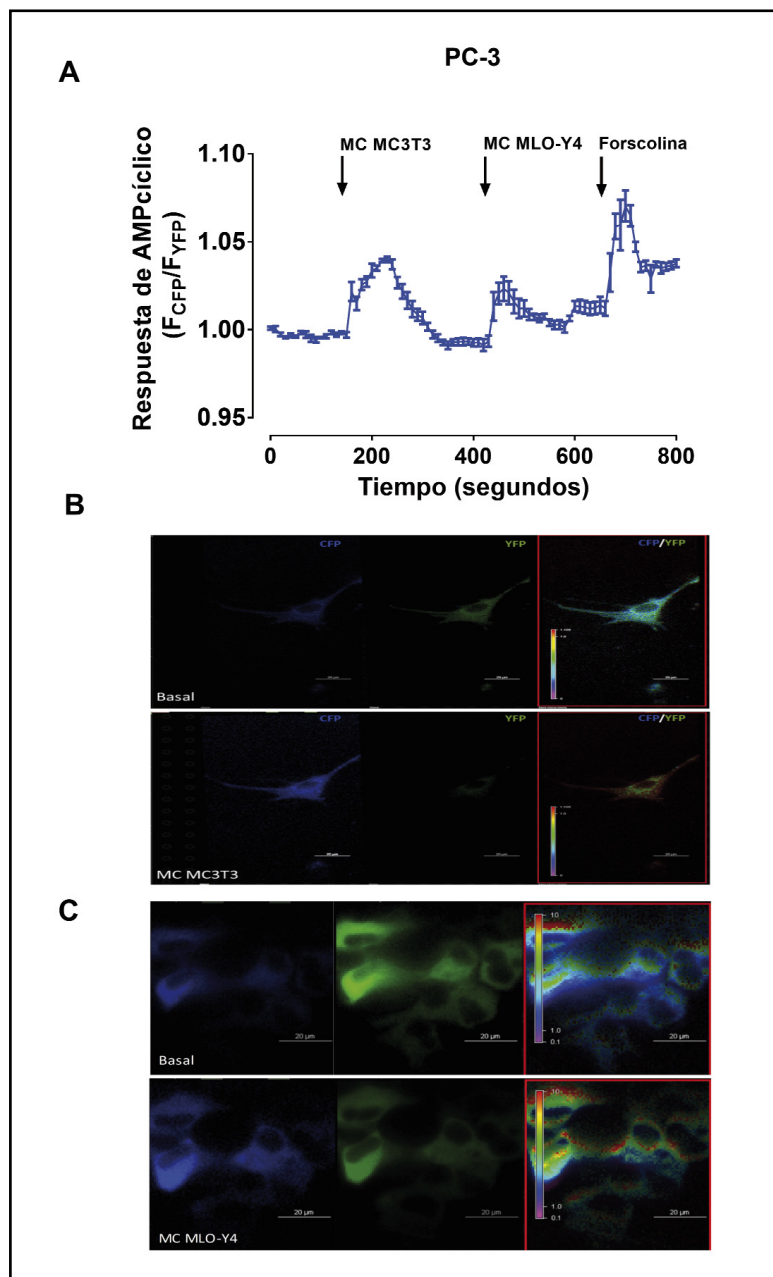


Figura 3. Factores secretados por MC3T3-E1 y MLO-Y4 aumentan la señalización de AMP cíclico de PC-3. (A) Se analizaron los efectos de factores secretados de medios condicionados obtenidos durante 24 horas de MC3T3-E1 y MLO-Y4 en la activación de AMP cíclico de PC-3. La evaluación de AMP cíclico se realizó mediante fluorescencia confocal en células vivas con el sensor CFPEPACYFP según se ha descrito en el texto. Las flechas indican el momento de la estimulación con medios condicionados. Se utilizó forskolina para obtener el máximo de estimulación de AMP cíclico. Los datos mostrados son medias \pm error estándar de 3 experimentos independientes. (B y C) Imágenes representativas de los cambios en fluorescencia de las proteínas fluorescentes CFP e YFP del sensor de AMP cíclico EPAC en células PC-3 tras la estimulación con medio condicionado de células MC3T3-E1 o MLO-Y4



células residentes del hueso para modular la actividad de las células tumorales en los nichos metastásicos. Se ha observado que los osteocitos estimulados mecánicamente por incremento de la presión ocasionada por tumores metastásicos inducen crecimiento e invasividad de tumores de próstata mediante la secreción de la quimiocina (C-C) ligando 5

(CCL5)³¹. Curiosamente, la estimulación de células de distintos tipos de cáncer por CCL5 es capaz de aumentar la capacidad invasiva y migratoria de células tumorales mediante mecanismos dependientes de la movilización intracelular de calcio³² o de activación de la quinasa ERK^{33,34}. Estas observaciones sugieren que CCL5 u otros factores similares del secretoma de células óseas podrían ser los responsables de los cambios en vías de señalización de células tumorales que hemos observado en el presente estudio. Por otra parte, publicaciones previas también han demostrado el papel clave de las células óseas para promover la activación de células tumorales y favorecer los procesos metastásicos basados en el contacto directo célula ósea-célula tumoral mediante la activación de la vía de señalización Notch-Jagged³⁵. Es posible que factores secretados por células óseas puedan mediar procesos de reclutamiento y crecimiento iniciales del tumor metastásico, en los que no haya contacto directo entre el tumor y las células óseas, mientras que vías de señalización como Notch-Jagged puede que regulen las interacciones del tumor en fases metastásicas más avanzadas (en las que el tumor sí entre en contacto directo con las células del hueso).

En base a estas investigaciones y a nuestros resultados proponemos que las células osteobásticas y osteocíticas regulan la proliferación y la activación de mediadores moleculares de la progresión tumoral en células metastásicas de cáncer de próstata mediante la secreción de factores solubles. Sugerimos, además, que la modulación de los mediadores intracelulares calcio, AMP cíclico y ERK 1/2 por factores secretados por células óseas pueden ser clave en el establecimiento de metastasis óseas por parte de células tumorales de próstata.

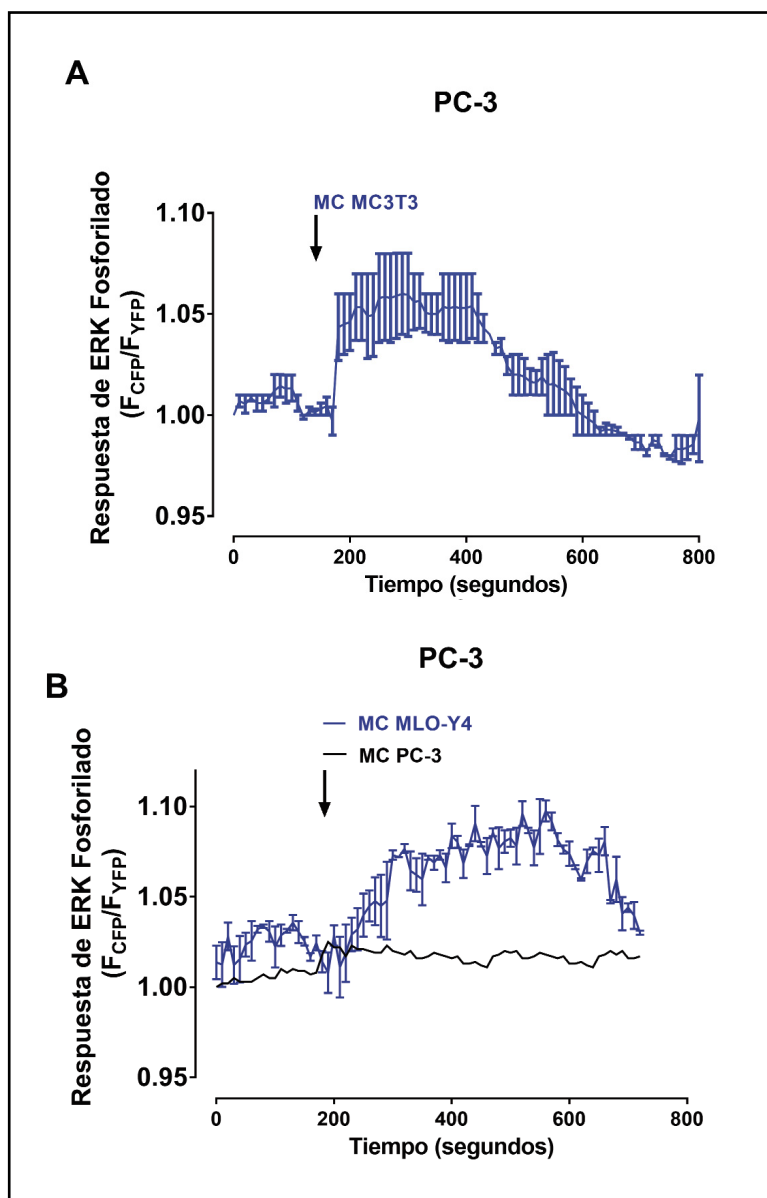
Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Financiación: Este trabajo se realizó gracias a proyectos del Instituto de Salud Carlos III (PI12/02390) y CEU San Pablo-Santander (USP-BS-PPC 11/2012, USPB-BS-APP-2/2016 y MERMERG-2).

Bibliografía

1. Wong MC, Goggins WB, Wang HH, Fung FD, Leung C, Wong SY, et al. Global incidence and mortality for prostate cancer: analysis of temporal patterns and trends in 36 countries. *Eur Urol.* 2016;70(5):862-74.
2. Kan C, Vargas G, Pape FL, Clézardin P. Cancer cell colonisation in the bone microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10):1-16.
3. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med.* 2004;350(16):1655-64.
4. Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 Pt 2):6213-7.
5. Keller ET, Brown J. Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity. *J Cell Biochem.* 2004;91(4):718-29.
6. Ell B, Kang Y. SnapShot: bone metastasis. *Cell.* 2012;151(3):690-690.e1.
7. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2013;19(11):1423-37.
8. Suva LJ, Washam C, Nicholas RW, Griffin RJ. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(4):208-18.
9. Liao J, Schneider A, Datta NS, McCauley LK. Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res.* 2006;66(18):9065-73.
10. Fajardo AM, Piazza GA, Tinsley HN. The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment. *Cancers (Basel).* 2014;6(1):436-58.
11. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1263-84.
12. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001; Appendix 3: Appendix 3B.
13. Wang B, Ardura JA, Romero G, Yang Y, Hall RA, Friedman PA. Na/H exchanger regulatory factors control parathyroid hormone receptor signaling by facilitating differential activation of G(alpha) protein subunits. *J Biol Chem.* 2010;285(35):26976-86.
14. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem.* 2004;279(36):37215-8.
15. Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, et al. Development of an optimized back bone of FRET biosensors for kinases and GTPases, *Mol Biol Cell.* 2011;22(23):4647-56.
16. Alonso V, Ardura JA, Wang B, Sneddon WB, Friedman PA. A naturally occurring isoform inhibits parathyroid hormone receptor trafficking and signaling. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):143-55.

Figura 4. Factores secretados por MC3T3-E1 y MLO-Y4 aumentan la fosforilación de la quinasa ERK 1/2 de PC-3. Se analizaron los efectos de factores secretados de medios condicionados obtenidos durante 24 horas de MC3T3-E1 (A) o MLOY-4 (B) en la fosforilación de la quinasa ERK 1/2 en PC-3. A modo de control se estimularon células PC-3 con medio condicionado de células PC-3. La evaluación de AMP cíclico se realizó mediante fluorescencia confocal en células vivas con el sensor CPERK-NESYFP según se ha descrito en el texto. Las flechas indican el momento de estimulación con medios condicionados. Los datos mostrados son medias ± error estándar de 3 experimentos independientes



17. Karlsson T, Sundar R, Widmark A, Landström M, Persson E. Osteoblast-derived factors promote metastatic potential in human prostate cancer cells, in part via non-canonical transforming growth factor β (TGFB) signaling. *Prostate.* 2018;78(6):446-56.
18. Thompson WR, Rubin CT, Rubin J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene.* 2012;503(2):179-93.
19. Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. MAP kinases and prostate cancer. *J Signal Transduct.* 2012;2012:169170.
20. Ottewill PD. The role of osteoblasts in bone metastasis. *J Bone Oncol.* 2016;5(3):124-7.

21. Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM, Jung Y, Mishra A, Joseph J, et al. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest.* 2011; 121(4):1298-312.
22. Shaked Y, McAllister S, Fainaru O, Almog N. Tumor dormancy and the angiogenic switch: possible implications of bone marrow-derived cells. *Curr Pharm Des.* 2014;20(30):4920-33.
23. Aguirre-Ghiso JA, Ossowski L, Rosenbaum SK. Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. *Cancer Res.* 2004;64(20):7336-45.
24. Cui C, Merritt R, Fu L, Pan Z. Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7(1):3-17.
25. Caretta A., Mucignat-Caretta C. Protein kinase A in cancer. *Cancers.* 2011;3(1):913-26.
26. Borland G, Smith BO, Yarwood SJ. EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *Br J Pharmacol.* 2009;158(1):70-86.
27. Graff JR, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, et al. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24500-5.
28. Chen H, Zhou L, Wu X, Li R, Wen J, Sha J, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer. *Front Biosci.* 2016;21:1084-91.
29. Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res.* 2010;70(3):1225-35.
30. Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmit B, Lepage G, et al. Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell.* 2014;26(1):19-32.
31. Sottnik JL, Dai J, Zhang H, Campbell B, Keller ET. Tumor-induced pressure in the bone microenvironment causes osteocytes to promote the growth of prostate cancer bone metastases. *Cancer Res.* 2015;75(11):2151-8.
32. Singh SK, Mishra MK, Eltoum IA, Bae S, Lillard JW Jr, Singh R. CCR5/CCL5 axis interaction promotes migratory and invasiveness of pancreatic cancer cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):1323.
33. Huang CY, Fong YC, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, et al. CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(5):794-803.
34. Kato T, Fujita Y, Nakane K, Mizutani K, Terazawa R, Ehara H, et al. CCR1/CCL5 interaction promotes invasion of taxane-resistant PC3 prostate cancer cells by increasing secretion of MMPs 2/9 and by activating ERK and Rac signaling. *Cytokine.* 2013;64(1):251-7.
35. Sethi N, Dai X, Winter CG, Kang Y. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell.* 2011;19(2):192-205.