



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

# **Función del receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada LOX-1 en la progresión tumoral del cáncer de próstata.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

IVÁN ANTONIO GONZÁLEZ CHAVARRÍA  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2016

Profesor Guía: Dr. JORGE ROBERTO TOLEDO ALONSO  
Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Cs. Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

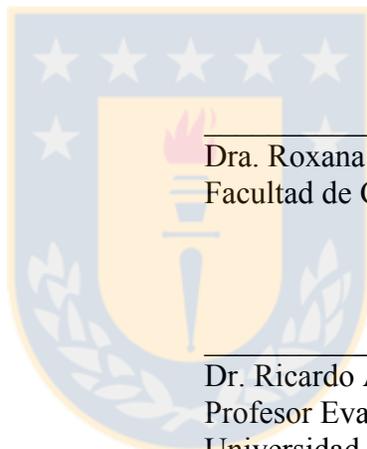
Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso  
Profesor Guía  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Sergio Oñate Betancour  
Facultad de Medicina



---

Dra. Roxana Pincheira Barrera  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Ricardo Armisen Yañez  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de Chile

---

Dr. Juan Pablo Henríquez H.  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias  
Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>2.- ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>3.- ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>X</b>
<b>4.- ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>XII</b>
<b>5.- RESUMEN</b>	<b>XIV</b>
<b>6.- SUMMARY</b>	<b>XVII</b>
<b>7.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
7.1. Liproteínas plasmáticas, LDL y fenómenos oxidativos	1
7.2. Estructura del receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada LOX-1	4
7.3 Expresión y función del receptor LOX-1	7
7.4. LOX-1, oxLDL y su relación con cáncer y la progresión tumoral	10
7.5. Invasión celular en cáncer, posibles funciones de LOX-1 y la oxLDL	19
7.6. La angiogénesis tumoral, posibles funciones de LOX-1 y oxLDL	26
<b>8.-PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>31</b>
<b>9.-HIPÓTESIS</b>	<b>32</b>
<b>10.-OBJETIVO GENERAL</b>	<b>33</b>
<b>11.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>33</b>
11.1. Determinar los niveles de expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares de cáncer de próstata y generar modelos celulares con expresión reducida de este receptor	33
11.2. Determinar la función de la oxLDL y del receptor LOX-1 en la angiogénesis de células humanas de cáncer próstata	34
11.3. Determinar la función del receptor LOX-1 en la transición epitelio mesenquimal, la invasión y el crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata humanas	35
<b>12.-MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
12.1. Cultivo Celular	36

12.2. Animales de experimentación	38
12.3. Obtención de LDL	39
12.4. Generación de LDL oxidada (oxLDL)	41
12.5. Determinación del cambio de movilidad electroforética de la oxLDL	41
12.6. Determinación de la concentración de malondialdehído MDA en oxLDL	42
12.7. Construcción del vector plasmídico de transferencia lentiviral pLU6W	42
12.8. Digestión de los vectores y purificación de los fragmentos.	43
12.9. Construcción del vector plasmídico de transferencia lentiviral para expresión de shRNA contra LOX-1	44
12.10. Ligación de los fragmentos	45
12.11. Transformación de bacterias competentes	45
12.12. Purificación de ADN plasmídico a escala mini preparativa	45
12.13. Análisis de colonias positivas para el producto de ligación (pLU6W/shRNA-LOX-1)	46
12.14. Purificación de ADN plasmídico a escala masiva	47
12.15. Determinación de la eficiencia de silenciamiento de los plasmídios que median la expresión de los shRNA/LOX-1	47
12.16. Generación de partículas lentivirales	48
12.16.1 Transfección de células HEK-293FT con polietilenimina	48
12.16.2. Producción y concentración de partículas lentivirales	49
12.17. Generación de líneas celulares estables de cáncer próstata a través de transducción lentiviral	50
12.17.1. Transducción de células C4-2 con vectores lentivirales Lv-shRNA-LOX-1, Lv-GFP, Lv-shRNA control	50
12.17.2. Selección de clones mediante dilución celular	50
12.17.3 Análisis de expresión del receptor LOX-1 mediante western blot en líneas celulares de cáncer de próstata y epitelio normal prostático.	51
12.18. Análisis de expresión del receptor LOX-1 en cáncer de próstata utilizando la base de datos de array públicas y Oncomine	52
12.19. Análisis del efecto de oxLDL en la expresión de marcadores pro-angiogénicos, marcadores de transición epitelio mesenquimal y LOX-1 en células de cáncer de próstata	52
12.19.1. Tratamientos de células de cáncer de próstata con oxLDL	52
12.19.2. Extracción de proteínas	53
12.19.3. SDS-PAGE y Western Blot de fluorescencia	53

<i>12.20. Análisis de la expresión relativa de marcadores de angiogénesis, transición epitelio mesenquimal y LOX-1 en células transfectadas con un siRNA contra LOX-1 y tratadas con oxLDL</i>	54
12.20.1. Transfección de siRNA en células de cáncer de próstata	54
12.20.2. Extracción de ARN total	55
12.20.3. Análisis de expresión relativa mediante PCR en tiempo Real de un paso	56
<i>12.21. Ensayos de angiogénesis en anillos aórticos de ratón</i>	57
<i>12.22. Ensayos de angiogénesis ex vivo en membranas corioalantoideas de embriones de pollo</i>	57
<i>12.23. Ensayo de agar suave o crecimiento celular independiente de anclaje</i>	58
<i>12.24. Zimograma para el análisis de la actividad gelatinasa de metaloproteínas en medio de cultivo de células tratadas con oxLDL</i>	59
<i>12.25. Inmunocitoquímica</i>	60
<i>12.26. Invasión celular o ensayo de curación de la herida</i>	60
<i>12.27. Ensayo de transmigración celular</i>	61
<i>12.28. Ensayos de xenograft subcutáneos en ratones nude</i>	61
<i>12.29 Análisis de datos</i>	62
<b>13.- RESULTADOS</b>	<b>67</b>
<i><u>13.1. Resultados objetivo 1. Determinar los niveles de expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares de cáncer de próstata y generar modelos celulares con expresión reducida de este receptor</u></i>	67
13.1.1. El mRNA para LOX-1 está sobreexpresado en carcinomas prostáticos humanos	67
13.1.2. El receptor LOX-1 está sobreexpresado en células de cáncer de próstata humanas	70
13.1.3. La oxLDL incrementa la expresión del receptor LOX-1	70
13.1.4. Construcción del vector pLU6W	73
13.1.5. Construcción de un plásmido de transferencia lentiviral para la expresión de un shARN contra el receptor LOX-1	73
13.1.6. Análisis funcional de los vectores plasmidiales pLU6W/shARN-LOX-1	76
13.1.7. Generación de líneas celulares de cáncer de próstata que expresan establemente un shRNA contra LOX-1	79
13.1.8. Generación de LDL oxidada mediante de la oxidación de LDL con iones Cu <sup>2+</sup>	85
<i><u>13.2. Resultados objetivo 2. Determinar la función de la oxLDL y del receptor LOX-1 en la angiogénesis de células humanas de cáncer próstata</u></i>	87

<i>13.2.1. La oxLDL induce la expresión de marcadores pro-angiogénicos en células humanas de cáncer de próstata</i>	87
<i>13.2.2. La expresión de marcadores pro-angiogénicos inducida por la oxLDL depende del receptor LOX-1</i>	91
<i>13.2.3. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve la generación de brotes vasculares en anillos aórticos de ratón</i>	98
<i>13.2.4. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve la angiogénesis de xenografts de células de cáncer de próstata en membranas corioalantoideas de embriones de pollo</i>	99
<i><u>13.3. Resultados objetivo 3. Determinar la función del receptor LOX-1 en la transición epitelio mesenquimal, la invasión y el crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata humanas</u></i>	102
<i>13.3.1. La oxLDL induce la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata</i>	102
<i>13.3.2. La expresión de marcadores de EMT inducida por oxLDL depende del receptor LOX-1</i>	106
<i>13.3.3. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve la transmigración de células de cáncer de próstata</i>	113
<i>13.3.4. La oxLDL incrementa la invasión celular en células de cáncer a través del receptor LOX-1</i>	113
<i>13.3.5. La activación de LOX-1 por la oxLDL incrementan la actividad gelatinasa de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9</i>	115
<i>13.3.6. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve una reestructuración del citoesqueleto de actina en el proceso de transición epitelio mesenquimal</i>	121
<i>13.3.7. La activación de LOX-1 por la oxLDL promueve la proliferación de células humanas de cáncer de próstata</i>	127
<i>13.3.8. La activación de LOX-1 por oxLDL incrementa el potencial tumorigénico de células de cáncer de próstata</i>	129
<i>13.3.9. el receptor LOX-1 es determinante para el crecimiento de xenograft subcutáneos de células de cáncer de próstata C4-2</i>	131
<b>14.- DISCUSIÓN</b>	<b>133</b>
<i>14.1. El receptor LOX-1 es sobre expresado en cáncer de próstata</i>	133
<i>14.2. La oxLDL induce la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata humanas</i>	135
<i>14.3. La oxLDL induce la expresión de marcadores pro-angiogénicos en células humanas de cáncer de próstata</i>	140

<i>14.4. La expresión de marcadores pro-angiogénicos inducida por la oxLDL depende del receptor LOX-1</i>	142
<i>14.5. La oxLDL y LOX-1 inducen una transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata</i>	145
<i>14.6. La oxLDL y LOX-1 inducen la migración e invasión de células humanas de cáncer de próstata</i>	149
<i>14.7. La oxLDL y LOX-1 aumenta la actividad de las MMPs de matriz 2 y 9 en células humanas de cáncer de próstata</i>	151
<i>14.8. La oxLDL y LOX-1 inducen una reestructuración del citoesqueleto de actina en células humanas de cáncer de próstata</i>	153
<i>14.9. La oxLDL y LOX-1 induce un aumento de proliferación celular en células de cáncer de próstata</i>	156
<i>14.10. La oxLDL y el receptor LOX-1 incrementan el potencial tumorigénico de células de cáncer de próstata</i>	160
<i>14.11. El receptor LOX-1 es determinante para el crecimiento de xenograft subcutáneos de células humanas de cáncer de próstata C4-2</i>	162
<b>15.-CONCLUSIÓN</b>	<b>166</b>
<b>16.-MODELO Y MECANISMO PROPUESTO</b>	<b>167</b>
<b>17.-BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>169</b>

## 2.- ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la lipoproteína de baja densidad (LDL)	3
<b>Figura 2.</b> Familia de receptores <i>scavenger</i> para lipoproteínas modificadas	5
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de los dominios estructurales del receptor LOX-1	8
<b>Figura 4.</b> Vías de transducción de señales activadas por el receptor LOX-1 de importancia fisiopatológica	12
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la EMT en cáncer	21
<b>Figura 6.</b> Modelo de "switch angiogénico"	27
<b>Figura 7.</b> Expresión del mRNA de LOX-1 en la base de datos de array públicos para la progresión del cáncer de próstata.	68
<b>Figura 8.</b> Expresión del mRNA para LOX-1 en tres bases para cáncer de próstata obtenidas desde ONCOMINE	69
<b>Figura 9 .</b> Análisis de la expresión de LOX-1 en las líneas de celulares de cáncer de próstata y epitelio normal prostático	71
<b>Figura 10.</b> Expresión de LOX-1 en células DU-145, C4-2 y LNCaP expuestas a concentraciones crecientes de oxLDL	72
<b>Figura 11.</b> Generación de vector de transferencia lentiviral pLU6W	74
<b>Figura 12.</b> Secuenciación del vector de transferencia lentiviral pLU6W y alineamiento con la secuencia de promotor U6	75
<b>Figura 13.</b> Construcción de los vector plasmidiales pLU6W/shARN LOX-1	77
<b>Figura 14.</b> Secuenciación y alineamiento de los vectores de transferencia lentiviral pLU6W/shRNAs	78
<b>Figura 15.</b> Expresión del receptor LOX-1 en células HEK/LOX-1(+) co-transfectadas con shARN/LOX-1 y pLGW	80
<b>Figura 16.</b> Inmunodetección del receptor LOX-1 en células HEK-293/LOX-1(+) co-transfectadas con los plásmidos pLU6W/shRNALOX-1 y pCMV-GFP	81

<b>Figura 17.</b>	Caracterización de clones de células C4-2 que expresan un shRNA contra el receptor LOX-1	83
<b>Figura 18.</b>	Caracterización de clones de células C4-2 que expresan un shRNA contra el receptor LOX-1 mediante inmunocitoquímica	84
<b>Figura 19.</b>	Generación de LDL oxidada mediante la oxidación de LDL con iones $\text{Cu}^{2+}$	86
<b>Figura 20.</b>	Expresión de marcadores pro-angiogénicos en células de cáncer de próstata LNCaP tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL	88
<b>Figura 21.</b>	Expresión de marcadores pro-angiogénicos en células de cáncer de próstata C4-2 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL	89
<b>Figura 22.</b>	Expresión de marcadores pro-angiogénicos en células de cáncer de próstata DU-145 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL	90
<b>Figura 23.</b>	Expresión relativa de LOX-1 en células LNCaP y DU-145 transfectadas con un siRNA contra LOX-1	93
<b>Figura 24.</b>	Expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos de células DU-145 transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y tratadas con oxLDL	94
<b>Figura 25.</b>	Expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos de células LNCaP transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y tratadas con oxLDL	95
<b>Figura 26.</b>	Expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos de células C4-2 shRNA/LOX-1 y shRNA control tratadas oxLDL	96
<b>Figura 27.</b>	Expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos en las líneas celulares estables cáncer de próstata C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con oxLDL	97
<b>Figura 28.</b>	Análisis de la capacidad angiogénica de medios condicionados de células de cáncer de próstata tratadas con oxLDL mediante el ensayo de generación de brotes de anillos aórticos de ratón	100
<b>Figura 29.</b>	Análisis de la función de LOX-1 y oxLDL en la angiogénesis tumoral de <i>xenografts</i> de células de cáncer de próstata en membranas corioalantoideas de embriones de pollo	101

<b>Figura 30.</b>	Expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata LNCaP tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.	103
<b>Figura 31.</b>	Expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata C4-2 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL	104
<b>Figura 32.</b>	Expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata DU-145 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.	105
<b>Figura 33.</b>	Expresión relativa de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata LNCaP transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y tratadas con oxLDL	109
<b>Figura 34.</b>	Expresión relativa de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata DU-145 transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y tratadas con oxLDL	110
<b>Figura 35.</b>	Expresión relativa de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con oxLDL	111
<b>Figura 36.</b>	Expresión relativa de marcadores EMT en las líneas celulares estables cáncer de próstata C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con oxLDL	112
<b>Figura 37.</b>	Análisis de migración de células de cáncer de próstata tratadas con oxLDL	114
<b>Figura 38.</b>	Ensayo de invasión celular “curación de la herida” de células LNCaP, C4-2 y DU-145 tratadas con oxLDL	117
<b>Figura 39</b>	Ensayo de invasión celular “curación de la herida” de células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control	118
<b>Figura 40.</b>	Análisis de actividad gelatinasa de las metaloproteínas de matriz 2 y 9 en medios condicionados de células LNCaP, C4-2 y DU-145 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL	119
<b>Figura 41.</b>	Análisis de actividad gelatinasa de metaloproteínas de matriz en medios condicionados de células C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1	120

<b>Figura 42.</b>	Inmunodetección de E-cadherina, vimentina y F-actina en células DU-145 tratadas con oxLDL	123
<b>Figura 43.</b>	Inmunodetección de E-cadherina, vimentina y F-actina en células LNCaP tratadas con oxLDL	124
<b>Figura 44.</b>	Inmunodetección de E-cadherina y F-actina en células C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1 tratadas con oxLDL	125
<b>Figura 45.</b>	Inmunodetección de vimentina y F-actina en células C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1 tratadas con oxLDL	126
<b>Figura 46.</b>	Análisis de proliferación en células de cáncer de próstata tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL	128
<b>Figura 47.</b>	Análisis del potencial tumorigénico de células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con oxLDL	130
<b>Figura 48.</b>	Ensayo de crecimiento tumoral de <i>xenografts</i> subcutáneos de células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA-control en ratones <i>nude</i>	132
<b>Figura 49.</b>	Modelo y mecanismos propuestos de la función de la oxLDL y LOX-1 en células humanas de cáncer de próstata	168

### 3.- ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Secuencias codificantes de shRNAs contra el receptor LOX-1	63
<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos y títulos utilizados para análisis de expresión mediante western blot	64
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos y títulos utilizados para inmunocitoquímica	65
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de los partidores utilizados para los análisis de expresión mediante PCR en tiempo real y esquema de perfiles térmicos para PCR en tiempo real de un paso.	66





#### 4.- ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**AKT:** proteína quinasa B del inglés *activated kinase murine thymoma*

**bp:** pares de base

**BSA:** albúmina de suero de bovino

**CMV:** citomegalovirus

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**EMT:** Transición epitelio mesenquimal

**ERK:** Quinasas reguladas por señales extracelulares del inglés *Extracellular-Regulated Kinase*

**FBS:** Suero Bovino fetal

**FITC:** Tiocianato de fluoresceína

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IKK:** IκB quinasa

**IL:** interleuquina

**IκB:** Inhibidor de factor nuclear kappa B

**kDa:** kiloDalton

**KO:** del inglés *Knock Out*

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**LOX-1:** Receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada

**LPC:** lisofosfatidilcolina

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos

**MEC:** Matriz extracelular

**mg:** Miligramo

**miRNA:** microRNA

**mL:** Mililitro

**mRNA:** ARN mensajero

**NFκB:** factor nuclear kappa B

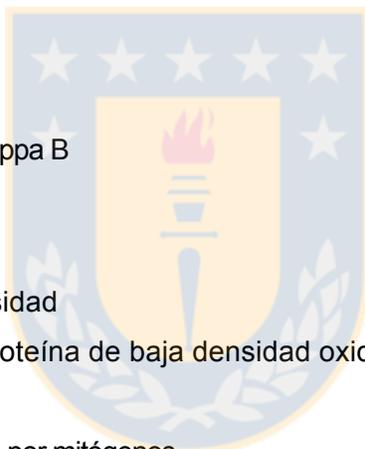
**oxLDL:** lipoproteína de baja densidad oxidada

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasas del inglés *Phosphoinositide-3 Kinase*

**PTEN:** Fosfatasa y tensina homólogo del inglés *Phosphatase and tensin homolog*

**Rac:** ras-related C3 botulinum toxin substrate 1



**RhoA:** Familia de genes homólogos de Ras, miembro A del inglés *Ras homolog gene family, member A*

**RNA:** ácido ribonucleico

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**shRNA:** ARN pequeño de horquilla

**siRNA:** ARN pequeño de interferencia

**TGF $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**TNF $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral alfa

**VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial

**ZEB1:** del inglés *Zinc finger E-box binding homeobox 1*

**$\mu\text{g}$ :** microgramo

**$\mu\text{L}$ :** Microlitro

**$\mu\text{m}$ :** Micrometros

**$\mu\text{M}$ :** Micromolar



## 5.- RESUMEN

La expresión y función del receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada LOX-1 se ha asociado a patologías como la disfunción endotelial, la aterosclerosis y la obesidad. En estas patologías la activación de LOX-1 por su ligando la oxLDL induce la activación de vías de señalización que promueven la proliferación, la angiogénesis, la migración e invasión celular; induciendo además, la expresión de moléculas pro-inflamatorias y la secreción de metaloproteinasas de matriz. Aspectos clínicos de la obesidad y la aterosclerosis como el aumento en las concentraciones de colesterol LDL y las formas oxidadas de estas lipoproteínas se han relacionado con la progresión tumoral y metástasis en cáncer de próstata. Sin embargo, no se han descrito los mecanismos por los cuales existe una potenciación de la progresión tumoral y la metástasis en pacientes obesos con altos niveles de oxLDL. Estudios recientes demostraron la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata y en adenocarcinomas prostáticos humanos de estadios clínico patológicos caracterizados por la invasión local y la generación de metástasis.

En base a los antecedentes descritos, proponemos que: *“El receptor LOX-1 está sobreexpresado en células humanas de cáncer próstata y su activación por la oxLDL promueve la angiogénesis e invasión, dos procesos asociados a la progresión tumoral de este tipo de cáncer”*. Para aceptar o refutar esta hipótesis planteamos como objetivo general determinar los niveles de expresión del receptor LOX-1 y su función en la angiogénesis e invasión celular, dos procesos asociados a la progresión tumoral del cáncer de próstata.

Nuestros resultados utilizando bases de datos de *microarrays* públicas de cáncer próstata demostraron que, el mRNA de LOX-1 se encuentra sobreexpresado en carcinomas y metástasis de pacientes con cáncer de próstata en comparación con el tejido prostático normal. De igual manera, demostramos que el receptor LOX-1 se encuentra sobreexpresado en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, C4-2, C4-2B, PC3, DU-145 y RWPE-2, respecto a la línea celular derivada de epitelio prostático normal RWPE1. Demostramos también, que la activación de LOX-1 por oxLDL promueve un aumento en la angiogénesis tumoral *in vitro* e *in vivo* mediante la inducción de la expresión de proteínas pro-angiogénicas como VEGF, MMP-2 y MMP-9. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve además, una transición epitelio mesenquimal de células humanas de cáncer de próstata mediante la disminución de marcadores epiteliales (E-cadherina y plakoglobina), y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina, N-cadherina, *snail*, *slug*, *twist* y *zeb1*). Además, determinamos que la activación de LOX-1 por oxLDL induce la invasión y migración de células de cáncer de próstata mediante inducción de la reestructuración del citoesqueleto de actina y la secreción y activación de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9. Al mismo tiempo, la activación de LOX-1 promueve la proliferación y aumenta el potencial tumorigénico de células humanas de cáncer de próstata, siendo LOX-1 un componente relevante en el crecimiento tumoral de *xenograft* subcutáneos de células humanas de cáncer de próstata en ratones *nude*.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que el receptor LOX-1 está sobreexpresado en células humanas de cáncer de próstata, y su activación por la oxLDL induce procesos asociados a la progresión tumoral, como la angiogénesis, la invasión y el crecimiento tumoral. De esta manera, proponemos que la estimulación de la progresión tumoral mediada por LOX-1 y oxLDL podría justificar a nivel molecular los datos epidemiológicos que correlacionan aspectos clínicos de la obesidad y el cáncer de próstata, donde pacientes obesos presentan una progresión tumoral acelerada y una mayor probabilidad de desarrollo de metástasis en comparación con pacientes normopeso.



## 6.- SUMMARY

The expression and function of the oxidized low-density lipoprotein receptor 1, LOX-1 has been associated with pathologies such as endothelial dysfunction, atherosclerosis and obesity. In these pathologies, activation of LOX-1 by oxLDL induces signaling pathways, which promote proliferation, angiogenesis, cell migration and invasion, with concomitant expression of pro-inflammatory molecules and matrix metalloproteinases. Clinical aspects of obesity and atherosclerosis such as high levels of LDL-cholesterol and oxidized forms of this lipoprotein have been associated with tumor progression and metastasis in prostate cancer. However, the mechanisms whereby tumor progression and metastasis is potentiated in obese patients with high levels of oxLDL have not been described yet. Recent studies showed the expression of LOX-1 in prostate cancer cells and human prostate adenocarcinomas with high clinic pathological stages, characterized by local invasion and metastasis.

Based on these data, we hypothesize that LOX-1 activation by oxidized low-density lipoprotein promotes tumor progression on human prostate cancer, through induction of angiogenesis, invasion and cell proliferation. To accept or refute this hypothesis, we propose to determine the role of LOX-1 receptor in tumor progression of human prostate cancer cells.

Our results demonstrate that LOX-1 receptor is overexpressed in the prostate cancer cells lines LNCaP, C4-2, C4-2B, PC3, DU-145 and RWPE-2, compared to the normal epithelial prostate cell line RWPE1. Additionally, we found in public databases of prostate cancer microarrays, that LOX-1 mRNA is over-

expressed in carcinomas and metastasis from prostate cancer patients compared to normal prostate tissue. Moreover, we demonstrated that activation of LOX-1 by oxLDL induces tumor angiogenesis in vitro and in vivo through inducing expression of pro-angiogenic proteins such as VEGF, MMP-2 and MMP-9. LOX-1 activation by oxLDL also promotes epithelial mesenchymal transition on human prostate cancer cells, through lowered expression of epithelial markers (E-cadherin and plakoglobin), and increased expression of mesenchymal markers (vimentin, N-cadherin, snail, slug, twist and zeb1). In addition, we determined that LOX-1 activation by oxLDL promotes invasion and migration of prostate cancer cells, with actin cytoskeleton restructuration and concomitant secretion and activation of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases. Furthermore, LOX-1 activation by oxLDL promotes proliferation and increases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells, being the LOX-1 receptor an important component in tumor growth of subcutaneous xenograft of human prostate cancer cells in nude mice.

In conclusion, our results showed that LOX-1 activation by its ligand oxLDL stimulates tumor progression of human prostate cancer cells, through induction of angiogenesis, invasion, migration and cell proliferation. Thus, we propose that stimulation of tumor progression mediated by LOX-1 and oxLDL may justify to molecular level the epidemiological data that correlate clinical aspects of obesity and prostate cancer, where the obese patients have a rapid tumor progression and high probability to develop metastasis compared to normal weight patients.

## 7.-INTRODUCCIÓN

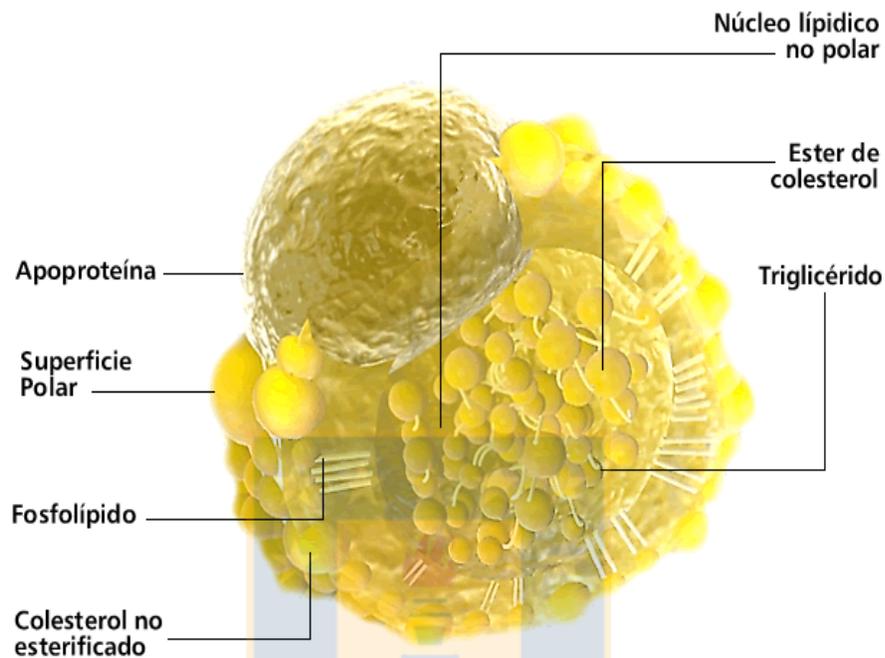
### 7.1. Liproteínas plasmáticas, LDL y fenómenos oxidativos.

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares encargados del transporte de lípidos en forma soluble a través de la circulación sanguínea [1]. Estructuralmente están compuestas por un núcleo interno de lípidos hidrofóbicos rodeados por una monocapa externa de lípidos anfipáticos polares de colesterol libre y fosfolípidos. Asociadas a la monocapa fosfolipídica se encuentran apolipoproteínas (apo) las cuales cumplen una función determinante en las interacciones ligando/receptor y en la mantención de la estructura de las lipoproteínas [2]. Las lipoproteínas se dividen en cinco clases en función de su densidad de hidratación, determinando su nomenclatura en: Quilomicrones (Qui), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) [3]. La LDL humana se define como el conjunto de lipoproteínas que pueden ser aisladas por ultracentrifugación en gradiente de densidad, con un rango de densidad entre 1,019 a 1,063 g/ml. Las moléculas de LDL son partículas esféricas con un diámetro de 19-23 nm y un peso molecular que oscila entre 1,8 y 2,8 x 10<sup>6</sup> Da [4]. Cada partícula de LDL contiene en promedio 1600 moléculas de ésteres de colesterol y 170 moléculas de triglicéridos formando un núcleo lipofílico central, rodeado de una monocapa externa, formada principalmente por unas 700 moléculas de fosfolípidos (mayoritariamente fosfatidilcolina y esfingomielina), 600 moléculas de colesterol libre y una cantidad variable de antioxidantes de la familia de los betacarotenos [5]. Asociados a la monocapa externa de lipoproteína se encuentra el único constituyente protéico de

las LDLs, la apolipoproteína B-100; la cual media el reconocimiento e internalización de las LDLs por receptores de alta afinidad para LDL nativa [6] (figura 1).

El contenido de antioxidantes endógenos y de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos constituyentes de las LDLs determinan la susceptibilidad a oxidación de estas lipoproteínas [7]. La oxidación de la LDL depende de la cantidad de estrés oxidativo al cual es expuesta y de las características químicas de su composición [8]. Así, los factores que promueven el estrés oxidativo como la radiación UV, humo del cigarro, inflamación crónica e infecciones también promueven la oxidación de la LDL [7].

Estudios realizados sobre las modificaciones oxidativas de las LDLs demostraron que los fenómenos oxidativos ocurren principalmente a nivel de los fosfolípidos y colesterol libre de la monocapa externa y en la apoproteína B-100 [9]. Las modificaciones por peroxidación lipídica efectuadas a través de ataques nucleofílicos por especies reactivas del oxígeno (ROS) como el ion superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos, son capaces de oxidar gran parte de los componentes lipídicos y proteicos externos de la LDL [10]. Los productos de oxidación final de la lipoperoxidación de la LDL generan una serie de aldehídos reactivos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, que se conjugan a grupos  $\epsilon$ -aminos de la apoproteína B-100 y fragmentan su estructura [11]. De esta manera, las modificaciones que ocurren a nivel lipídico y proteico en LDLs expuestas a oxidación generan un alto contenido de cargas negativas en la superficie de la lipoproteína impidiendo el reconocimiento e interacción de las LDL oxidadas con los receptores para LDL nativa [12]. Las lipoproteínas modificadas por oxidación, desde mínimamente oxidadas hasta



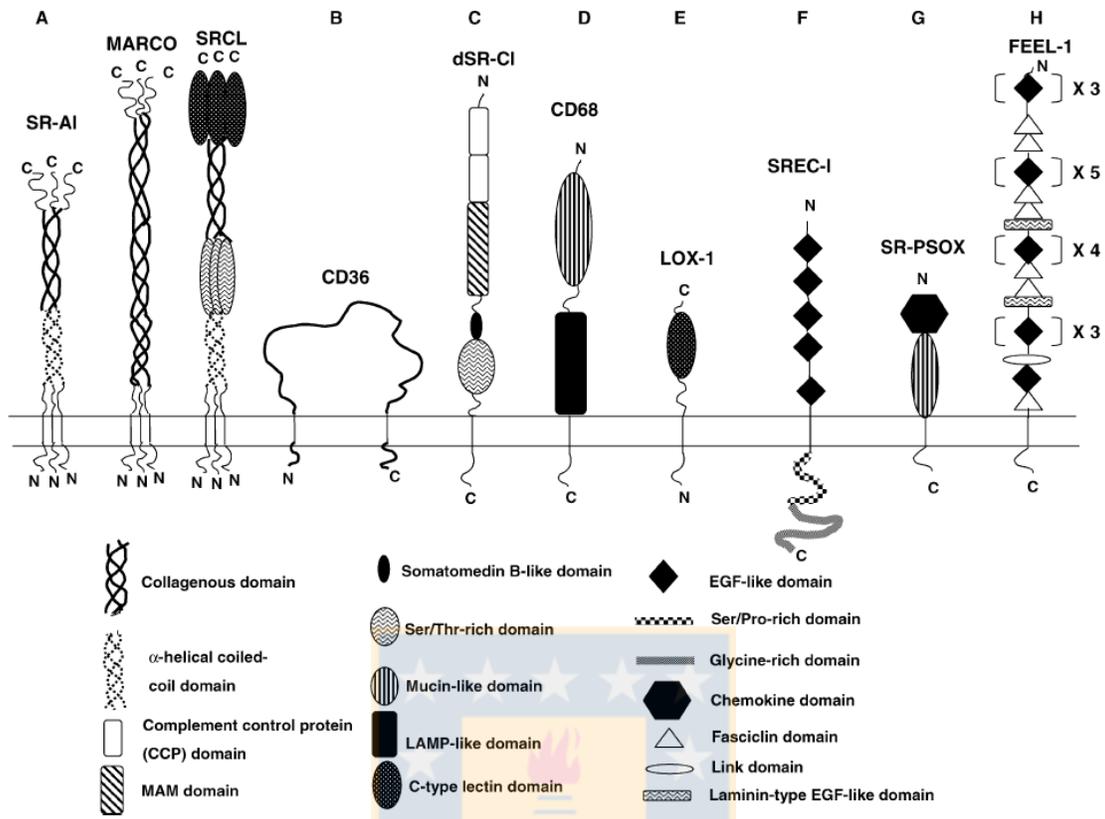
**Figura 1. Representación esquemática de la lipoproteína de baja densidad (LDL).**

Las lipoproteínas de baja densidad están compuestas por un core de lípidos hidrofóbicos de colesterol esterificado y triglicéridos, rodeados por una capa externa de lípidos anfipáticos polares de colesterol no esterificado y fosfolípidos. Asociados a la superficie se encuentran proteínas específicas denominadas apoproteínas (ApoB100), encargadas de mantener la estructura de la partícula y actuar como ligando para receptores celulares.

totalmente oxidadas, son reconocidas por una familia de receptores de membrana catalogados como receptores *scavenger* para lipoproteínas modificadas [13]. Una característica relevante de estos receptores es su capacidad de unir una amplia variedad de lípidos y lipoproteínas, mostrando una mayor afinidad hacia especies modificadas por oxidación y acetilación en comparación con formas no modificadas o nativas de las lipoproteínas. Los receptores *scavenger* se clasifican en una familia que consta de 8 miembros: el receptor *scavenger* A tipo I y II (SR AI/II), CD36, SR BI, CD68, SREC, MARCO y el receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada LOX-1 [14] (figura 2).

## **7.2. Estructura del receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada LOX-1.**

En 1997 Sawamura y colaboradores clonaron desde células endoteliales de aorta de bovino un nuevo receptor para la oxLDL, el receptor para lipoproteína de baja densidad oxidada, LOX-1. Este receptor se describió como el principal receptor capaz de mediar la endocitosis de oxLDL en células endoteliales de grandes arterias [15]. El gen de LOX-1 humano (*olr-1*) se localiza en el cromosoma 12 dentro del conjunto de genes que codifican para receptores tipo lectina de células *natural killer* [16, 17]. Este receptor se clasifica como un receptor *scavenger* clase E, el cual regula la endocitosis de oxLDL, cuerpos apoptóticos, fosfolípidos aniónicos, bacterias y lipoproteínas modificadas [18, 19]. La expresión de LOX-1 se ha reportado en células endoteliales, células del sistema inmune (macrófagos) y en una amplia variedad de tejidos como: el endotelio vascular, la placenta, el hipocampo, testículos, riñón, cerebro y músculo esquelético, entre otros [17].



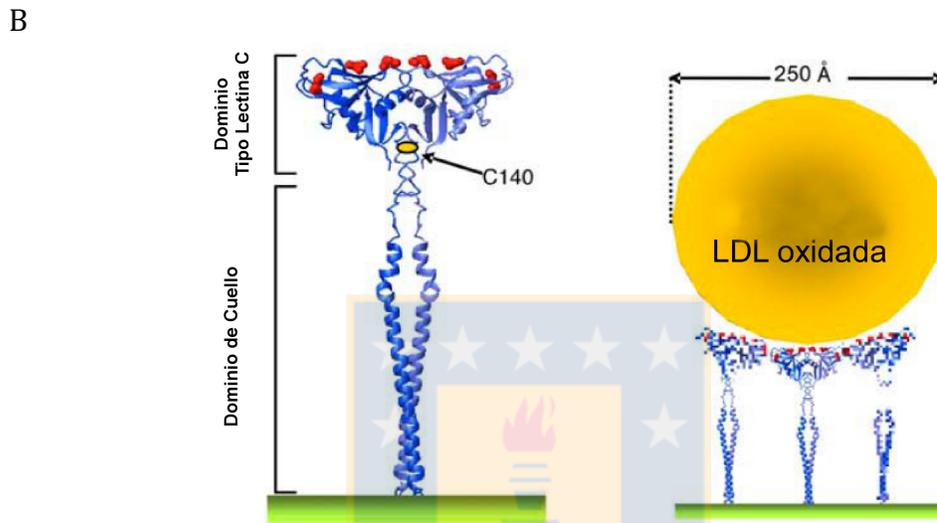
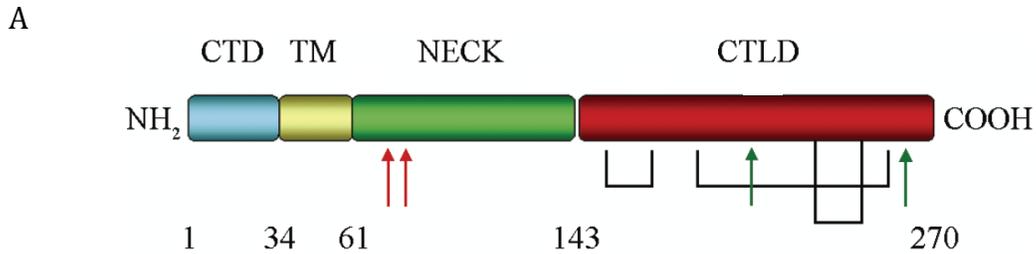
**Figura 2. Familia de receptores *scavenger* para lipoproteínas modificadas.** Las lipoproteínas modificadas son endocitadas por una familia de 8 miembros clasificados de la A hasta la H. Esta familia está compuesta por el receptor *scavenger* A tipo I y II (SR AI/II), CD36, SR BI, CD68, SREC, MARCO y el receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada LOX-1.

El receptor LOX-1 humano es una proteína de membrana tipo II de 30 kDa, perteneciente a la familia de receptores tipo C-lectina [20]. Estudios estructurales demostraron que LOX-1 posee 4 dominios; un dominio citoplasmático, un dominio transmembrana, un dominio de unión o cuello, y un dominio C-terminal tipo lectina-C [20] ( figura 3A). El dominio tipo lectina C se identificó como el sitio de reconocimiento de ligandos y como un componente esencial para el reconocimiento y unión de la oxLDL [21]. Estudios de mutagénesis sitio-dirigida demostraron que las secuencias y residuos en el dominio lectina C son esenciales para la localización sub-celular de LOX-1 y la unión de ligandos [22]. Así, la delección de los últimos 10 aminoácidos del extremo C-terminal (261-270) o sustituciones de Lys-262 y/o Lys-263 por Ala disminuyen la actividad de unión ligando/receptor, demostrando que la interacción de los residuos básicos con carga positiva presentes en el dominio de unión a ligando de LOX-1 son necesarios para la interacción con las cargas negativas superficiales de la oxLDL [23]. De igual manera, se demostró que las seis cisteínas de la región tipo lectina del extremo C-terminal, participan en la formación de enlaces disulfuro intracatenario de LOX-1 humano [24]. Se ha identificado que el receptor LOX-1 se presenta como un homodímero en la membrana de células CHO y HEK293 [25] [26]. Así también, se identificó que el homodímero de LOX-1 depende de enlace disulfuro intercatenario de la cisteína 140. Sin embargo, estudios de mutagénesis han señalado que en la mutante LOX-1 C140S en la cisteína que participa en el enlace intercatenario, mantiene la capacidad de formar oligómeros y unir oxLDL [27]. Además, utilizando análisis cuantitativo de fluorescencia, se determinó que existe un nivel de expresión umbral de LOX-1 para la unión de oxLDL y se demostró que la posibilidad de formar estructuras oligoméricas de este receptor depende de la

densidad de expresión del receptor en membrana. De esta manera, a partir de estudios de movilidad electroforética se determinó que el principal oligómero de LOX-1 es un hexámero compuesto de tres homodímeros. Así, en base al tamaño de la partícula de oxLDL se ha determinado que este holoigómero de tres homodímeros sería la forma funcional de LOX-1 para la unión de oxLDL [23] (Figura 3B).

### 7.3 Expresión y función de receptor LOX-1

La expresión y función de LOX-1 se ha asociado a patologías crónicas como: la aterosclerosis, el infarto agudo al miocardio, el síndrome metabólico, la dislipidemia, la hipertensión, la cardiopatía isquémica, el infarto cerebrovascular, la diabetes, los cuadros infecciosos e inflamatorios y el cáncer [28-30]. Se demostró que el receptor LOX-1 y su ligando la oxLDL son determinantes para el desarrollo y progresión de la aterosclerosis [31]. Las LDLs oxidadas y su internalización mediada por LOX-1 participan en varios procesos claves en la aparición y progresión de la placa ateromatosa, lesionando directamente el endotelio, alterando el tono vascular y aumentando la síntesis de moléculas de adhesión que facilitan el *rolling* de monocitos en el endotelio para su posterior trans migración a íntima de arterias durante el desarrollo de la placa aterosclerótica [32].



**Figura 3. A) Representación esquemática de los dominios estructurales del receptor LOX-1.** Los potenciales sitios de N-glicosilación se indican con asteriscos. Las posiciones de los tres enlaces disulfuros se muestran con uniones simples. Las flechas rojas indican los dos sitios potenciales de clivaje. Las flechas verdes indican los sitios de unión de oxLDL a los residuos de aminoácidos básicos del dominio C-terminal. Los números indican la posición de los aminoácidos dentro de los dominios CTD: dominio citoplasmático; TM: dominio transmembrana; NECK: dominio de cuello; CTLD: dominio tipo lectina C (Chen y col., 2007). **B) Representación esquemática de la estructura cuaternaria del receptor LOX-1.** El receptor LOX-1 presenta una conformación homodimérica con la formación de un enlace intercatenario de las cisteínas 140. Formación de estructuras hexámicas en la superficie de la membrana celular es la organización necesaria para poder unir una molécula de oxLDL, basada en la estructura cristalina del dominio C-terminal tipo lectina y el tamaño de oxLDL (modificado de Ohki y col., 2005).

De igual manera, LOX-1 en conjunto con el receptor *scavenger* SR-A1 es fundamental para la incorporación oxLDL por parte de macrófagos, los que contribuyen en la formación de células espumosas y la formación de la estría grasa, dos procesos claves en el desarrollo de la aterosclerosis [33]. Además, la interacción de oxLDL y LOX-1 promueve la proliferación y movilización de las células musculares lisas, la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y metaloproteinasas de matriz las cuales contribuyen a la desestabilización y ruptura de la placa ateromatosa inestables [34, 35].

Un aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno, en las concentraciones de oxLDL y en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , Ang-II y endotelina, se han descrito como inductores de la expresión de LOX-1 [36, 37]. También, la lisofosfatidilcolina (LPC) uno de los componentes mayoritarios de las oxLDLs, induce un aumento en la expresión de LOX-1 a nivel de ARNm y proteína en células de endotelio de aorta de bovino BAEC en forma de tiempo y dosis dependiente. En este sentido, el bloqueo del receptor con anticuerpos dirigidos contra el sitio de unión a ligando previene el aumento en la expresión de LOX-1 mediada por oxLDL y lisofosfatidilcolina [38, 39].

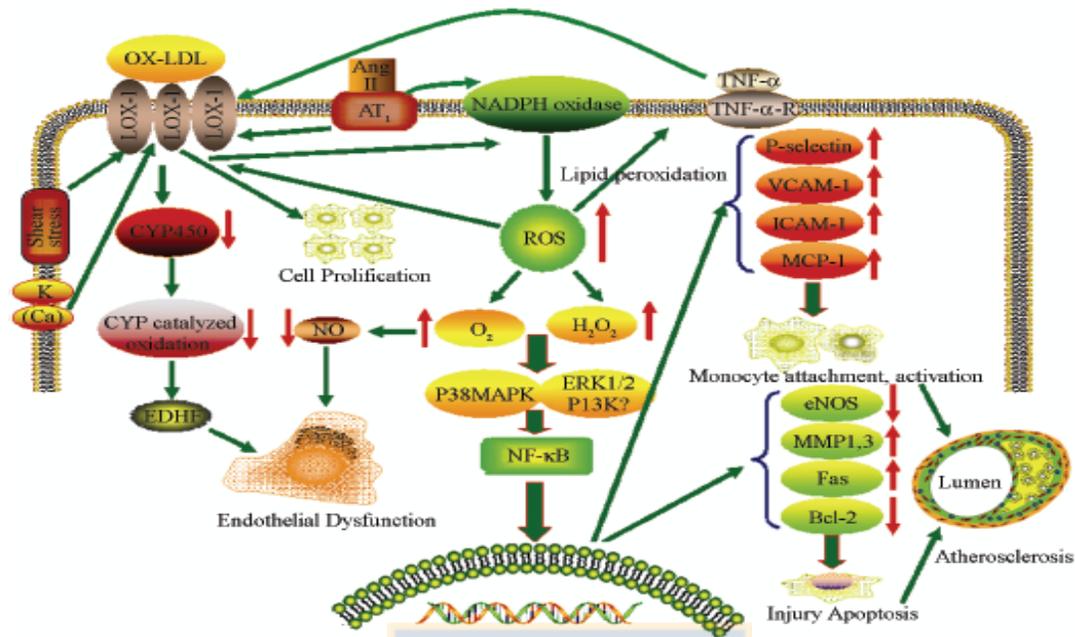
Se ha descrito que la activación de LOX-1 induce vías de señalización intracelulares que inducen la activación de proteínas quinasas y factores de transcripción, que regulan la expresión de genes relacionados a la proliferación, la invasión, angiogénesis y motilidad celular. Así, se ha reportado que la activación de LOX-1 por oxLDL en diversos tipos celulares puede inducir la activación de vías de señalización que involucran a la NADPH oxidasa, p38 (MAPK), p44/42 MAPK, ERK 1/2, la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa B (PKB o Akt), la proteína quinasa

activada por p21 (PTK) y los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 [40] [41] (figura 4). De esta manera, dependiendo del tipo celular y de las concentraciones de oxLDL, la activación de LOX-1 puede inducir la expresión de genes involucrados en inflamación, proliferación, invasión y angiogénesis [42]. Además, se ha determinado que LOX-1 promueve la activación de las GTPasas Rho y Rac modulando procesos de migración celular [43].

#### **7.4. LOX-1, oxLDL y su relación con cáncer y la progresión tumoral**

Estudios realizados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y la organización mundial de la salud determinaron que en el mundo se presentaron alrededor de 14 millones de nuevos casos de cáncer el año 2012 y se estimó que para el año 2030 el número de pacientes con cáncer por año habrá aumentado a más de 23,98 millones [44]. Muchos de los tipos de cáncer que se predicen irán en aumento como el cáncer de mama, colon, recto y próstata, se han asociado mayoritariamente a países desarrollados y en vías de desarrollo. Hábitos conductuales presentes en estas sociedades como el consumo de tabaco y dietas hipercalóricas son asociados como factores de riesgo en el desarrollo de cáncer [45]. De la misma manera, la obesidad se ha asociado como un factor de riesgo en muchos tipos de patologías, como la aterosclerosis, diabetes mellitus tipo 2 y el cáncer [46]. La obesidad se ha asociado con un incremento sustancial del riesgo de desarrollar una amplia gama de tipos de cáncer como: el cáncer esofágico, colon, rectal, hígado, biliar, pancreático, riñón, linfomas no-Hodgkins, mieloma múltiple, estómago, mama, útero, cérvix, ovario y próstata [47]. En este sentido, el cáncer de próstata es uno de los tipos de cáncer más comunes en la población masculina occidental [48]. Datos obtenidos por

la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) demostraron que el cáncer de próstata ocupa el segundo lugar en incidencia dentro del total de neoplasias y el quinto lugar en el índice de mortalidad a nivel mundial. En Chile, el cáncer de próstata se ha identificado como el cáncer con mayor incidencia (28%) en la población masculina reportándose un total de 5681 casos confirmados de esta neoplasia en el año 2012 y un total 2029 defunciones por este tipo de cáncer, posicionándolo como la segunda causa de muerte por cáncer en la población masculina chilena. Así, el cáncer de próstata ha sido catalogado como un problema de prioridad de salud pública para ministerio de salud de Chile [49]. A nivel epidemiológico se han observado una serie de factores de riesgo que predisponen el desarrollo del cáncer de próstata; así, la edad avanzada, la raza, factores genéticos y hormonales han sido asociados como importantes factores de riesgo para esta neoplasia [50, 51]. Estudios epidemiológicos han determinado una asociación entre la obesidad y el riesgo de desarrollar cáncer de próstata. Así también, la estratificación del cáncer de próstata en estadios clínico patológicos o el grado de malignidad del tumor en pacientes obesos con cáncer de próstata han demostrado que obesidad esta relacionada con un mayor riesgo de desarrollar cáncer con estadios de alta malignidad, o metástasis [52]. A mayor tasa de obesidad, mayor es el riesgo de desarrollar cáncer de próstata con tumores de alto grado de malignidad. Esta teoría es apoyada por un meta-análisis, en donde se muestra que pacientes con alto índice de masa corporal (IMC), presentan mayor prevalencia de cáncer de próstata con alto grado de malignidad, en comparación a pacientes con IMC normal [53].



**Figura 4. Vías de transducción de señales activadas por el receptor LOX-1 de importancia fisiopatológica.** oxLDL, TNF- $\alpha$ , estrés vascular, ROS y Ang II aumentan la expresión de LOX-1. La unión de oxLDL a LOX-1 activa a la NADPH oxidasa en la membrana celular a través de un mecanismo aún desconocido que se traduce en el rápido aumento de ROS intracelular incluyendo  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . El incremento en concentraciones de ROS promueven la activación de p38 MAPK, ERK 1/2 y PI3K y la subsecuente activación NF- $\kappa$ B el cual promueve la transcripción de moléculas de adhesión como P-selectina, VCAM, ICAM-1 y MCP-1, que favorecen la activación y adhesión de monocitos en procesos de disfunción endotelial. De igual manera, activación de LOX-1 disminuye la expresión de eNOS y Bcl-2 y aumenta la expresión de MMP-1, 3, 9 y Fas, promoviendo la lesión y apoptosis de células endoteliales. Sin embargo, la activación de LOX-1 también se ha reportado que LOX-1 y su activación con bajas concentraciones de oxLDL promueven la proliferación celular (Chen y *col.*, 2007).

En este sentido, incluso la obesidad juvenil ha presentado correlación positiva con el aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer de mama, ovario, endometrial, colon y próstata [54]. Pacientes diagnosticados con síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias crónicas y condiciones de autoinmunidad muestran una alta incidencia y agresividad en la formación del tumor y su estabilidad [55]. Sin embargo, muchas de las drogas utilizadas para el tratamiento de desórdenes del metabolismo lipídico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 tales como: sulindac, tocilizumab, simvastatina, cerulenina y metformina inhiben la progresión tumoral en muchos tipos de cáncer [56].

La inflamación es un factor comúnmente asociado con la aparición de cáncer y su progresión, así como, en el desarrollo de patologías asociadas a desórdenes metabólicos [57]. Se ha estimado que entre un 15%-20% de todas las muertes por cáncer están relacionadas con inflamación e infecciones. Así, las moléculas inflamatorias que se encuentran recurrentemente elevadas en muchos tipos de cáncer suministran señales que favorecen la proliferación, invasión y angiogénesis de las células tumorales [57-59].

Se ha demostrado que LOX-1 está sobre expresado en pacientes obesos y desempeña una función determinante en la activación de señales pro-inflamatorias, proliferativas y angiogénicas durante el inicio y progresión de la aterosclerosis [60, 61]. En este sentido, se ha propuesto que las vías de señalización activadas por la oxLDL y LOX-1 durante la aterosclerosis podrían ser compartidas con las vías de señalización que determinan la progresión tumoral [30]. De esta manera, se han identificado programas transcripcionales comunes

entre cáncer y patologías del metabolismo lipídico, en los que 25 genes involucrados en patologías del metabolismo lipídico son importantes para la transformación de células cancerígenas [30, 62]. En este contexto, se identificó que el gen de LOX-1 (*olr-1*) es uno de estos 25 genes y cumple un rol fundamental en la mantención de la transformación tumoral de diversas líneas celulares cancerígenas. Además, se determinó que el receptor LOX-1 se encuentra sobreexpresado en carcinomas prostáticos y mamarios con estadios clínico patológicos III y IV, los cuales se caracterizan por el aumento en la invasión local del tumor y por la generación de metástasis [30]. Análisis de expresión de genes relacionados con la transformación celular realizados en ratones *KO* y silvestres para LOX-1 revelaron que 25 de 238 genes sobre expresados durante la transformación celular de células de cáncer de mama se inhiben en más del 20% en los tejidos de ratones *KO* para LOX-1. Así, la expresión de estos 25 genes dependientes de la activación de LOX-1 están asociados a apoptosis, proliferación, cicatrización de heridas, angiogénesis, defensa inmune y poseen secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en sus promotores [62]. La activación de LOX-1 por oxLDL en la línea celular de epitelio mamario MCF10A genera un aumento en la proliferación celular, en conjunto con un aumento en la expresión de lipooxigenasas 12-15 y las sub-unidades p22 phox/p27 phox de la NADPH oxidasa mediado por la activación la vía del NF- $\kappa$ B y la estimulación de las isoformas p44/p42 de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K ) y proteína kinasa B (Akt) [63].

De manera independiente del control mediado por NF- $\kappa$ B, se demostró que la pérdida de expresión de LOX-1 causa una inhibición en actividad y expresión de enzimas que participan en el metabolismo lipídico como la ATP-citratoliasa, la acetil-coenzima A carboxilasa, ácido graso sintasa, esteroil-CoA desaturasa, y el miembro 6 de la familia de enzimas encargada de la elongación de los ácidos grasos de cadena larga (ELOVL) [62]. En este sentido, la síntesis *de novo* de ácidos grasos saturados sólo se produce en el hígado y el tejido adiposo y esencialmente no se produce en otros tejidos. Sin embargo, se ha determinado que muchos tipos de cáncer incluyendo el de próstata y el cáncer de mama se basan casi exclusivamente en la síntesis *de novo*, independientemente de la disponibilidad nutricional de la célula [64]. Los niveles de expresión de la sintasa de ácidos grasos (FASN) se correlacionan positivamente con una pobre prognosis en cáncer en una amplia variedad de tumores [65]. De manera similar, la sobreexpresión de la enzima esteroil-CoA desaturasa (SCD1) se ha observado en varios tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de mama y próstata [66]. La sobre expresión de SCD1 está asociada con transformación celular y su inhibición reduce la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, resultando en una disminución de la proliferación celular, una pérdida de adhesión y alteraciones en la apoptosis de células tumorales [66, 67]. Es por esto, que la regulación mediada por LOX-1 de enzimas implicadas en metabolismo lipídico posicionan a este receptor como un regulador fundamental en la transformación celular y en la lipogénesis de células cancerígenas.

Las células tumorales obtienen colesterol desde la circulación por medio de la endocitosis de LDL, regulada por receptores de membrana para LDL nativa y por síntesis endógena [64]. Sin embargo, la regulación de la retroalimentación de la internalización y síntesis se pierden en células tumorales de cáncer de próstata, resultando en una activación de la vía de síntesis de colesterol (vía del mevalonato) y un incremento de la expresión de receptores de alta afinidad para LDL [68]. En consecuencia, la célula tumoral aumenta la captación de colesterol promoviendo por mecanismos aun no descritos la proliferación celular e invasión en muchos tipos de cáncer.

Especial relevancia ha cobrado la relación entre el colesterol y el cáncer de próstata, ya que la síntesis de andrógenos, hormonas esteroideas sintetizadas a partir del colesterol son fundamentales en el desarrollo y mantención del cáncer de próstata [69]. En condiciones fisiológicas los andrógenos están implicados en la adquisición de caracteres sexuales secundarios, el crecimiento y el desarrollo normal de la próstata. Sin embargo, también se han relacionado con la progresión tumoral en cáncer de próstata [70]. Así, una de las terapias tradicionales en pacientes con cáncer próstata es la privación de andrógenos [71]. Este tratamiento tiene como propósito inhibir la síntesis de andrógenos de la principales fuentes de estas hormonas en el cuerpo. A menudo, este tratamiento implica la castración química de los testículos, los cuales representan la mayor fuente productora de andrógenos en hombres, teniendo como premisa que este agotamiento de andrógenos elimina la principal fuerza impulsora del crecimiento, proliferación y diferenciación en la próstata [72]. Si bien estos tratamientos inicialmente son muy exitosos, es inevitable que en más del 80% de estos casos el cáncer reaparezca

[73]. El cáncer recurrente presenta mayor agresividad y capacidad de invasión, no respondiendo a las terapias tradicionales, lo cual resulta en un pronóstico negativo para estos pacientes [72]. Esta forma recurrente de cáncer de próstata se denomina independiente de andrógenos, refractario a las hormonas o andrógenos insensible [74]. El término más reciente y aceptado es cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), ya que refleja el conocimiento que el cáncer de próstata es re-emergente y no es independiente de los andrógenos o su influencia, como se ha reportado previamente [75]. La recurrencia de cáncer de próstata en la forma resistente a la castración se debe a una serie de cambios moleculares interrelacionados y complejos, muchos de los cuales aún no están completamente descritos. En las últimas décadas, la investigación se ha dirigido hacia la elucidación de los mecanismos que estarían implicados en la reincidencia del cáncer de próstata en pacientes tratados con privación de andrógenos. Estudios revelan que a pesar de existir bajos niveles de andrógenos en circulación en pacientes con cáncer de próstata tratados con privación de andrógenos el receptor de andrógeno y niveles de andrógenos intratumorales permanecen elevados permitiendo la progresión tumoral del cáncer de próstata resistente a la castración [76]. Uno de los mecanismos propuestos para explicar este fenómeno es que las células tumorales son capaces de sintetizar andrógenos *de novo* a partir del colesterol obtenido por la célula cancerígena [70]. Muchos de los cánceres de próstata refractarios a la privación de andrógenos sobre expresan el receptor para LDL y aumentan la captación de colesterol al interior de tumor para la generación de andrógenos, induciendo la activación del receptor de andrógenos, que promueve la activación transcripcional de genes blancos involucrados en la

proliferación, crecimiento y supervivencia de las células tumorales [68]. Sin embargo, cuando se utilizaron ratones *knockout* para el receptor de LDL no se mostraron cambios en la producción de esteroides sugiriendo que existen otros receptores involucrados en la captación de colesterol y la síntesis de esteroides [77]. En las condiciones oxidantes del microambiente tumoral es poco probable que la endocitosis de LDL ocurra mediada por receptores para LDL nativa, ya que la oxidación de la LDL en estas condiciones es inminente y endocitosis debería estar mediada por receptores *scavenger* para oxLDL presente en las células tumorales. Resultados recientes respaldarían esta premisa ya que pacientes con cáncer de próstata avanzado o metastásico presentan altas concentraciones de oxLDL en circulación [78].

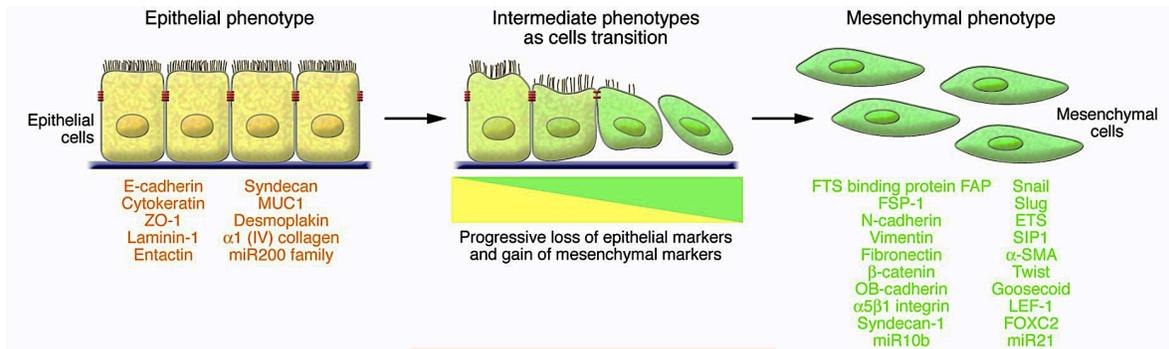
Por otro lado, estudios randomizados de pacientes tratados con hipolipemiantes del tipo estatinas (un inhibidor de la síntesis de colesterol), demostraron que estos fármacos reducen significativamente el crecimiento tumoral en cáncer colorectal, de melanoma, de mama y próstata, demostrando así, la importancia del metabolismo del colesterol para la progresión tumoral [79]. De la misma manera, se ha observado que líneas celulares de cáncer de próstata tratadas con estatinas, presentan una disminución en la proliferación celular [80]. Se ha demostrado que células de cáncer de próstata PC3, DU-145 y LNCaP tratadas con lovastatina promueven el arresto del ciclo celular y la senescencia en un mecanismo que involucra a la GTPasa pequeña RhoA [81, 82]. Las estatinas son antagonistas de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA), una enzima esencial en la síntesis de mevalonato una molécula precursora fundamental en la síntesis endógena del colesterol. De esta manera los

tratamientos con estatinas generan una disminución en los grupos prenil derivados del mevalonato como farnesil pirofosfato (FPP) y geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), los cuales son esenciales para la translocación de Ras, Rho y Rac-1 desde el citoplasma a membrana plasmática, o bien en su interacción con proteínas de membrana [83]. De esta manera los tratamiento con lovastatina previenen la correcta localización de estas GTPasas disminuyendo por tanto la actividad de estas enzimas en procesos determinantes de la progresión tumoral como la proliferación y la motilidad celular [84]. Además, un estudio reciente demostró que lovastatina es un potente inhibidor competitivo de LOX-1, y previene la interacción y endocitosis de oxLDL.

#### **7.5. Invasión celular en cáncer, posibles funciones de LOX-1 y la oxLDL.**

La migración celular es crucial en muchos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la inmunidad, la angiogénesis y la metástasis [85]. La metástasis se describe como un proceso capaz de mediar la migración de las células tumorales desde el sitio de iniciación a órganos distantes [86]. En este sentido la adhesión y migración de células tumorales desde el tumor primario al torrente sanguíneo, su adhesión a la pared endotelial y la posterior transmigración endotelial es esencial en el proceso metastásico [87]. Uno de los procesos previos necesarios para la generación de metástasis en muchos carcinomas como el cáncer de próstata y mama, es la invasión local y diseminación de células tumorales al estroma circundante en un proceso conocido como transición epitelio mesenquimal (EMT) [87]. La transición epitelio mesenquimal es un proceso complejo en el cual las células originalmente

epiteliales pierden sus características para adquirir un fenotipo mesenquimal. En este proceso existen cambios drásticos en el fenotipo celular generando la pérdida de interacciones célula-célula, así como, la pérdida de la polaridad ápico-basal y una drástica reorganización de citoesqueleto de actina y las adhesiones focales (figura 5) [88]. La pérdida de expresión de E-cadherina es uno de los cambios iniciales para la generación de la EMT y es considerado un marcador primordial de este proceso [89]. La E-cadherina tiene un rol esencial en la homeóstasis epitelial, así la disminución en su expresión inicia el descenso en la expresión y/o organización de una serie de marcadores epiteliales adicionales, como proteínas desmosomales (plakoglobina, desmoglobinas, desmoplaquinas), uniones ocluyentes, (ZO-1) y componentes de la polaridad celular (proteínas dlg o lgl) [90]. Concomitantemente, existe un aumento en la expresión de proteínas de células mesenquimales tales como vimentina, fibronectina y N-cadherina, así como, de enzimas remodeladoras de la matriz extracelular (metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9). De igual manera, durante este proceso aumenta la expresión de factores de transcripción como snail, slug, twist y zeb1/2, los cuales modulan la represión transcripcional de genes importantes en la mantención de la estructura epitelial de la célula como E-cadherina y promueven la expresión de genes mesenquimales [91]. Además, en este proceso de EMT las células reorganizan drásticamente su citoesqueleto de actina y las interacciones célula-matriz para facilitar los procesos de motilidad celular. Así, se ha descrito que las células que adquieren características mesenquimales durante la EMT son capaces de moverse a través de la reestructuración y redistribución dinámica del citoesqueleto mediada por la activación de las GTPasas Rho, Rac y Cdc42 [92].



**Figura 5. Representación esquemática de la EMT en cáncer.** La EMT implica una transición funcional de las células epiteliales polarizadas a células mesenquimales móviles. Durante este proceso las células epiteliales pierden progresivamente la expresión de las proteínas encargadas de mantener la estructura del epitelio y aumentan de forma progresiva la expresión de proteínas mesenquimales que facilitan la invasión y motilidad celular.

Al inicio del proceso de EMT las células generan protrusiones mediadas por la activación de Cdc42 y Rac, las que favorecen la polimerización de actina en el frente de migración induciendo la formación de protrusiones en la membrana plasmática llamadas filopodia y lamelipodias [93]. Posteriormente, en un proceso mediado por Rac las protrusiones generadas contactan el sustrato y forman nuevas adhesiones célula-matriz dependientes de integrinas; los nuevos complejos de adhesión son estabilizados y estructurados para obtener nuevas adhesiones focales. Por último, el núcleo y el cuerpo celular se translocan por la acción de fuerzas contráctiles de filamentos de acto-miosina en un proceso mediado por Rho, la retracción las adhesiones focales en el borde de cola se desensamblan y el borde de retrasado en cola es arrastrado [94, 95]. La remodelación del citoesqueleto tiene una importante función en la adquisición de características mesenquimales durante el proceso de EMT, determinando la capacidad de movilización de las células durante este proceso [87]. La EMT fue originalmente descrita en embriogénesis como un proceso esencial para el desarrollo de estadios específicos que requieren de la migración y la diferenciación transciende de células del epitelio embrionario en procesos como la gastrulación y la migración de células de la cresta neural [89]. El desarrollo de la EMT es un proceso espacio temporal altamente dinámico y estrechamente regulado. La EMT se describe como un proceso relevante en la progresión tumoral no solo implicado en la invasión tumoral sino también durante la metástasis y en resistencia terapéutica del cáncer [96]. Durante la invasión de un carcinoma, la EMT provee a las células tumorales la capacidad de disociarse una de otra, degradar y migrar dentro de la membrana basal e invadir el tejido conectivo

adyacente[97]. Interesantemente, el proceso inverso, conocido como transición mesenquimal epitelial, también es esencial en la embriogénesis y juega un rol determinante en el establecimiento de células tumorales a nuevos órganos en la metástasis tumoral [98]. La combinación de esta data refuerza el concepto que la EMT puede considerarse como un proceso dinámico y en muchas instancias un evento reversible durante la progresión tumoral [99]. Estos hallazgos han generado un gran interés en el entendimiento de reguladores moleculares y/o inductores de EMT desde aspectos básicos a translacionales, para identificar nuevos marcadores y blancos terapéuticos del proceso tumorigénico [100].

En este sentido algunos estudios han asociado a la obesidad como un importante factor capaz de promover la invasión tumoral. La comparación entre pacientes obesos y pacientes normolipémicos han determinado que pacientes obesos poseen altos niveles de leptina, VEGF, PAI-1, interleukina-6 (IL-6), oxLDL y bajos niveles de testosterona. Así, la administración de sueros de ratones obesos en líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, PacMetUT1 y DU-145 induce un aumento en la invasión, migración y actividad de metaloproteinasas de matriz, en conjunto con la generación de una EMT demostrando que los factores presentes en circulación de ratones obesos son capaces de favorecer la progresión tumoral en cáncer de próstata a través de la generación de una EMT [101].

Respecto de la función de oxLDL y LOX-1 en la EMT, un estudio determinó que concentraciones crecientes de oxLDL (1-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24) incrementan la expresión de LOX-1 acompañado del aumento en la expresión del marcador

mesenquimal  $\alpha$ -sma y una disminución del marcador epitelial E-cadherina en células de epitelio renal de rata NRK-52E. Sin embargo, la utilización de algunos bloqueadores químicos no específicos de LOX-1 como carragenina y Poli-I previnieron los efectos inducidos por oxLDL demostrando que la activación de LOX-1 por la oxLDL inducen una EMT en células NRK-52E [102].

Adicionalmente, se ha demostrado que la regulación de la expresión de LOX-1 por TNF- $\alpha$  en células endoteliales promueve la adhesión y trans migración de células de cáncer de mama (MDA-MB-231) a células endoteliales, efecto que puede ser prevenido al incubar células endoteliales con anticuerpos bloqueadores de la unión a ligando de LOX-1, sugiriendo que la sobre-expresión de LOX-1 potencia la progresión tumoral e invasión local en el cáncer de mama [103]. Como ya se describió, la activación de LOX-1 estimula una serie de cascadas de señales que involucran aumento de las ROS, la activación de p38 (MAPK) y la proteína quinasa C, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, incrementado la producción de citoquinas proinflamatorias y expresión de metaloproteinasas de matriz, las cuales están directamente relacionadas con la progresión de cáncer y la generación de metástasis [104].

Otros tipos de receptores de lipoproteínas modificadas como el receptor LDL asociado a Proteína 1, un receptor *scavenger* que media la endocitosis y degradación de proteínas modificadas, se ha relacionado con procesos de invasión y migración en células de carcinoma de folículo tiroideo. La activación de este receptor genera una remodelación en el citoesqueleto de actina y una reestructuración de los complejos de adhesión focal mediado por la activación de

quinasas de adhesión focal (FAK) que desestructuran estos complejos en procesos de motilidad de líneas celulares de carcinoma tiroideo [105].

Además, se ha reportado que LRP1 en células de glioblastoma multiforme U87 induce la expresión de la metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9 promoviendo la migración e invasión celular en un mecanismo dependiente de la activación de ERK [106].

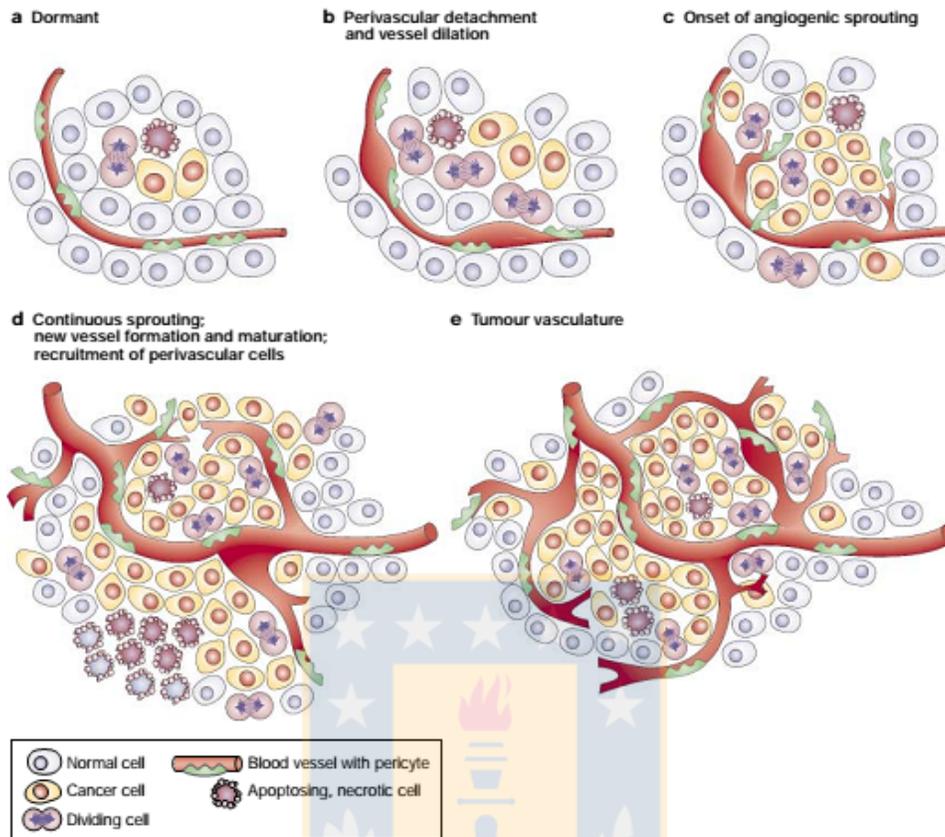
La función de oxLDL y LOX-1 en procesos de invasión y migración celular también han sido reportados. Así, un estudio demostró que la activación de LOX-1 por oxLDL en células endoteliales de aorta de bovino promueve la activación de Rho y Rac-1, dos GTPasas que median la reestructuración del citoesqueleto de actina en procesos de motilidad celular [39]. Además, se reportó que la activación de LOX-1 induce la expresión y activación de las metaloproteinas de matriz MMP-2 y MMP-9 facilitando procesos de invasión de células musculares lisas y macrófagos en la progresión de la aterosclerosis [107].

Resultados obtenidos por nuestro laboratorio demostraron la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata DU-145. En estas líneas celulares LOX-1 se expresa en la membrana plasmática e internaliza a su ligando oxLDL en forma específica, de manera dosis y tiempo dependiente. Interesantemente, se determinó que altas concentraciones de oxLDL inducen una pérdida de adherencia de las células DU-145 a la placa de cultivo, efecto que fue prevenido con la utilización de anticuerpos policlonales dirigidos contra el dominio extracelular de unión a ligando de este receptor. Además, se determinó que LPC, uno de los mayores componentes fosfolipídicos de las oxLDL, homologa la acción

de oxLDL sobre células de cáncer de próstata DU-145 provocando la inducción de la expresión de LOX-1 y la pérdida de adhesión celular a través de la activación de LOX-1 [108].

## **7.6. La angiogénesis tumoral, posibles funciones de LOX-1 y oxLDL**

La angiogénesis es un proceso fisiológico que determina la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes [109]. Se considera un fenómeno normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Sin embargo, también es un proceso fundamental en la progresión tumoral [110]. Se ha descrito que la angiogénesis es necesaria para el desarrollo y progresión de múltiples tumores. Una gran cantidad de evidencia demuestra que los tejidos cancerosos poseen una mayor vascularización en comparación con los tejidos normales [111]. Así, la microvasculatura tumoral es un marcador pronóstico de muchos de muchos tipos de cáncer [112]. La formación de redes vasculares en cáncer por un lado provee al tumor de un mayor aporte nutrientes, oxígeno y por otro lado facilita la invasión de las células tumorales a la circulación sanguínea promoviendo la diseminación de estas células a órganos distantes [100]. La angiogénesis por tanto es un regulador fundamental en la progresión tumoral capaz de promover el crecimiento tumoral y la metástasis [113]. La angiogénesis tumoral se regula por un balance preciso entre moléculas pro y anti-angiogénicas liberadas por las células tumorales o células del estroma tumoral, como fibroblastos y macrófagos, que determinan el *switch* sobre la angiogénesis tumoral (figura 6) [110, 113]. Los genes involucrados en la angiogénesis tumoral se transcriben en respuesta a una serie de estímulos,



**Figura 6. Modelo de "switch angiogénico".** A) La mayoría de los tumores comienzan como nódulos avasculares (inactivo) hasta que alcanzan un nivel estable de células en proliferación y apoptóticas. B) Se produce un desprendimiento perivascular y una dilatación de los vasos sanguíneos. C) Protrusión de vasos sanguíneos. D) Formación de nuevos capilares y la maduración. E) La formación de vasos continúa acorde con crecimiento tumoral, proporcionando de este modo nutrientes que satisfacen las necesidades metabólicas de las células tumorales y facilitan el escape de células tumorales en procesos de metástasis [114].

como la hipoxia, estrés oxidativo e inflamación. En este sentido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), se identificó como uno de los mayores promotores de angiogénesis en tumores ricamente vascularizados [113]. Estímulos como la hipoxia, secreción de citoquinas y el estrés oxidativo pueden aumentar la expresión de VEGF en las células tumorales, induciendo la generación de nueva vasculatura asociada al tumor, promoviendo crecimiento, la progresión tumoral y metástasis [115]. La vasculatura formada en el tumor en respuesta a VEGF es estructuralmente y funcionalmente anormal. Los vasos sanguíneos poseen formas irregulares, tortuosas y con terminaciones sin continuidad debido a la falta de una organización de vénulas, arteriolas y capilares. Además, muchos de los vasos sanguíneos del tumor poseen una mayor permeabilidad con fenestraciones mayores lo que hace a este tipo de vasculatura propensa a la ruptura [97]. Estas características de la vasculatura tumoral determinan que el flujo sanguíneo al tumor sea sub-óptimo, resultando en un mayor grado de hipoxia y por ende una mayor producción de moléculas pro angiogénicas como el VEGF [116]. En adición, la activación del factor inducible por hipoxia HIF-1, uno de los mayores inductores de la producción de VEGF, también activa rutas de estrés oxidativo e inflamación a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B promoviendo aun más la generación de angiogénesis. En estas condiciones la generación de ROS también es incrementada en el tejido tumoral, así las ROS funcionan como moléculas capaces de iniciar y/o modular la angiogénesis en el tumor. El efecto de ROS sobre la angiogénesis son en parte mediados por la sobre expresión de VEGF a nivel de proteína y ARNm [117, 118].

Estudios *in vitro* demostraron que la estimulación de las células humanas endoteliales de vena umbilical con oxLDL activa la expresión del receptor LOX-1, generando una sobre expresión de moléculas de adhesión, proteínas inflamatorias y proteínas de remodelación como las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, las cuales también están vinculadas en la angiogénesis [119]. Además, se demostró que concentraciones de oxLDL inferiores a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  promueven la formación de tubos capilares regulados por LOX-1 y la activación de la vía NADPH oxidasa/MAPK/NF- $\kappa$ B, la cual desencadena un aumento en la producción de VEGF a nivel de ARNm y proteína [120]. Otros experimentos *ex vivo*, mostraron que la Angiotensina II estimula la formación de capilares, y que este fenómeno se atenúa significativamente por la utilización anticuerpos anti-LOX-1 [121]. Por otra parte, Ang II no induce la generación de brotes capilares desde anillos aórticos de ratones LOX-1 *K.O* en comparación con el anillos aórticos de ratones de tipo salvaje [121]. La delección de LOX-1 reduce significativamente la formación de vasos en la neovascularización coroidal inducida por injuria laser en modelos murinos [122]. La hipoxia, el principal inductor de la angiogénesis tanto en la aterogénesis como en la tumorigénesis, se reportó como un inductor de la angiogénesis, a través de la sobre expresión de LOX-1, la activación y sobre expresión de la sub-unidad p47phox de la NADPH oxidasa [123]. La producción de ROS mediada por NADPH oxidasa activa quinasas que fosforilan la sub-unidad inhibitoria de NF- $\kappa$ B (iKb) permitiendo la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B para promover la transcripción de sus genes blancos involucrados en la angiogénesis tumoral como VEGF y la invasión tumoral (snail y slug dos represores

transcripcionales de E-cadherina) [124]. Estos estudios nos permiten postular que el receptor LOX-1 y su activación por oxLDL podrían regular la angiogénesis tanto en patologías vasculares como en la progresión tumoral.



## 8.-PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La expresión y función del receptor para la LDL oxidada, LOX-1 se asocia a de patologías como disfunción endotelial, aterosclerosis y obesidad [28-30]. En estas patologías la oxLDL a través del receptor LOX-1 activa vías de señalización que promueven la proliferación, motilidad celular y angiogénesis; incrementando además, la expresión de moléculas pro-inflamatorias y la secreción de metaloproteinasas de matriz [34, 35]. Aspectos clínicos de la obesidad y la aterosclerosis como el aumento en las concentraciones de colesterol LDL y las formas oxidadas de estas lipoproteínas han sido relacionados con la progresión tumoral y metástasis en cáncer de próstata [125] . Sin embargo, los mecanismos por los cuales existe una potenciación de la progresión tumoral y metástasis en pacientes obesos con cáncer de próstata, no han sido descritos. Estudios recientes mostraron la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata y en adenocarcinomas prostáticos humanos de estadios clínico patológicos caracterizados por la invasión local y la generación de metástasis [30]. A partir de esta información nosotros nos planteamos la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es la función de LOX-1 y su activación por oxLDL en la angiogénesis y la invasión, dos procesos asociados a la progresión tumoral del cáncer de próstata?.

## 9.-HIPÓTESIS.

La expresión y función del receptor LOX-1, se asocia a una serie de patologías como disfunción endotelial, aterosclerosis y obesidad. Varios de los aspectos clínicos de estas patologías como el aumento en los niveles de colesterol LDL y la forma oxidada de esta lipoproteína se relacionan con la progresión tumoral y la metástasis en cáncer de próstata. Sin embargo, los mecanismos por los cuales existe un reforzamiento de estos procesos en pacientes dislipidémicos aún no se han descrito. Recientemente en nuestro laboratorio se identificó la expresión del LOX-1 en células humanas de cáncer de próstata. Además, durante el desarrollo de nuestra investigación otros grupos han reportado una alto nivel de expresión de LOX-1 en adenocarcinomas prostáticos humanos con estadios clínico patológicos avanzados, caracterizados por la invasión local y la metástasis. En base a los antecedentes expuestos nuestra hipótesis plantea que:

**El receptor LOX-1 está sobreexpresado en células humanas de cáncer próstata y la activación por su ligando la oxLDL promueve la angiogénesis y la invasión celular, dos procesos asociados a la progresión tumoral de este tipo de cáncer.**

## 10.-OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión del receptor LOX-1 y su función en la angiogénesis e invasión de células humanas de cáncer de próstata.

## 11.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**11.1. Determinar los niveles de expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares de cáncer de próstata y generar modelos celulares con expresión reducida de este receptor.**

Se determinará mediante western blot la expresión relativa del receptor LOX-1 en las líneas celulares de cáncer de próstata RWPE-2, PC-3, DU-145, C4-2, C4-2B y LNCaP en comparación con la línea de epitelio normal prostático RWPE-1. Además, analizaremos la expresión del mRNA de LOX-1 en adenocarcinomas prostáticos humanos y en tejido metastásico de pacientes con cáncer de próstata utilizando bases de datos de *microarray* públicos. Una vez determinada la expresión del receptor LOX-1 en células cáncer de próstata generaremos modelos con la expresión disminuida de este receptor, utilizando herramientas moleculares de interferencia en la traducción del ARNm de este receptor. Para esto se generarán vectores lentivirales que medien la expresión de un shRNA contra el receptor LOX-1, y se utilizarán para modificar genéticamente la expresión del receptor en la línea celular de cáncer de próstata C4-2, los clones que integren las secuencias serán seleccionados por dilución limitante y caracterizados a través de western blot, PCR en tiempo real e inmunocitoquímica. Además, se generarán modelos de expresión reducida de LOX-1, para las líneas celulares DU-145 y LNCaP, utilizando un siRNA específico contra el receptor, y su funcionalidad será corroborada a través de western blot. Estos modelos

celulares de cáncer de próstata con la expresión disminuida de LOX-1 se utilizarán para determinar la función de este receptor en la progresión tumoral del cáncer de próstata frente a un estímulo con su ligando oxLDL.

### **11.2. Determinar la función de la oxLDL y del receptor LOX-1 en la angiogénesis de células humanas de cáncer próstata.**

Se analizará a través de western blot el efecto de concentraciones crecientes de oxLDL en la expresión de los marcadores pro-angiogénicos VEGF, MMP-2 y MMP-9, en tres líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP, C4-2 y DU-145). Para determinar si los efectos inducidos por oxLDL sobre la expresión de los marcadores pro-angiogénicos son mediados por el receptor LOX-1 se utilizarán las líneas celulares C4-2/shRNALOX-1 y las líneas celulares LNCaP y DU-145 transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1. Finalmente, se realizarán estudios de generación de brotes tipo capilar en anillos aórticos de ratón tratados con medios condicionados de células C4-2/shRNALOX-1 tratadas con o sin oxLDL, para determinar si los efectos en la expresión de moléculas pro-angiogénicas tienen un efecto biológico en la generación de la angiogénesis tumoral. Además, se realizarán ensayos de conteo de vasos sanguíneos en *xenografts* de células C42/shRNA-LOX-1 inoculadas sobre membranas corioalantoídeas de embriones de pollo y pre-tratadas con oxLDL.

### **11.3. Determinar la función del receptor LOX-1 en la transición epitelio mesenquimal, la invasión y el crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata humanas.**

Se analizará a través de western blot el efecto de concentraciones crecientes de oxLDL en la expresión de los marcadores de transición epitelio mesenquimal E-cadherina, plakoglobina y vimentina, en tres líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP, C4-2 y DU-145). Para determinar si los efectos mediados por oxLDL sobre la expresión de los marcadores de transición epitelio mesenquimal son mediados por el receptor LOX-1 se utilizarán los modelos celulares C4-2, LNCaP y DU-145, que presentan una expresión reducida de LOX-1, y se analizará la expresión por PCR en tiempo real de los marcadores de EMT (Epiteliales: E-Cadherina y plakoglobina; mesenquimales: N-cadherina y vimentina; y factores de transcripción asociados a EMT: snail, slug, twist y ZBE-1). Analizaremos los efectos de oxLDL y LOX-1 en la migración, invasión y la actividad de las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y 9 en las líneas celulares LNCaP, C4-2 y DU-145. Además, se analizarán mediante inmunocitoquímica los efectos de oxLDL/LOX-1 en la remodelación del citoesqueleto de actina en los procesos de EMT.

Finalmente, se evaluarán los efectos de oxLDL/LOX-1 en la proliferación celular mediante ensayos de proliferación celular. Se estudiará la capacidad tumorigénica de las líneas celulares de cáncer de próstata C4-2/shRNA<sub>LOX-1</sub> tratadas con o sin oxLDL en ensayos de agar suave. Además, se determinará la relevancia del receptor LOX-1 en el crecimiento tumoral de *xenografts* subcutáneos de células humanas de cáncer de próstata de la línea C4-2 en ratones *nude*.

## 12.-MATERIALES Y MÉTODOS

### 12.1. Cultivo Celular.

Las líneas celulares HEK-293, LNCaP, PC-3, DU-145, C4-2, C4-2B, RWPE-1, RWPE-2 se obtuvieron del *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Md.).

**HEK-293.** La línea celular derivada de riñón embrionario humano HEK-293, fue generada a partir de la transformación de células de riñón de embrión humano con un adenovirus del tipo 5. Las células HEK-293 se cultivaron en medio DMEM, suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina (4 mM), estreptomicina-penicilina al 1% y piruvato 1 mM. Los cultivos de la esta línea celular se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%.

**LNCaP.** La línea celular de cáncer de próstata humana LNCaP, fue obtenida desde un aislado de ganglio linfático supraclavicular con evidencia de metástasis de carcinoma prostático de un paciente caucásico de 62 años de edad. Esta línea celular se cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-gentamicina al 1% y L-glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos de la esta línea celular se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%.

**PC-3.** La línea celular de cáncer de próstata humana PC-3, fue obtenida a partir de una metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de grado IV de un varón caucásico de 62 años de edad. Esta línea celular se cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-gentamicina al 1% y L-

glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos de la está línea celular se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%.

**DU-145.** La línea celular humana DU-145 fue obtenida de una metástasis cerebral de un carcinoma prostático. Esta línea celular se cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-gentamicina al 1% y L-glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos de la está línea celular se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%.

**C4-2.** La línea celular humana C4-2 fue aislada a partir de tumores generados por la co-inoculación de una línea de células estromales de la médula ósea y las células LNCaP C4 en ratones *nude* castrados. Esta línea celular se cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-gentamicina al 1% y L-glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos de la está línea celular se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%.

**C4-2B.** La línea celular humana C4-2B fue aislada a partir de metástasis óseas de xenoimplantes ortotópicos prostáticos de células de C4-2 en ratones *Nude* castrados. Esta línea celular se cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-gentamicina al 1% y L-glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos de la está línea celular se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%.

**RWPE-1.** Las células epiteliales de próstata RWPE-1 fueron obtenidas de la zona periférica de una próstata adulta humana histológicamente normal las cuales fueron transfectadas con una copia del virus del papiloma humano 18 (HPV-18) para establecer la línea RWPE-1. Esta línea celular se cultivó en medio de cultivo de queratinocitos libre de suero, suplementado con extracto de pituitaria bovina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y factor de crecimiento epitelial 5  $\text{ng}/\text{mL}$ . Los cultivos de esta línea celular se mantuvieron a  $37^{\circ}\text{C}$  en un ambiente humidificado con  $\text{CO}_2$  al 5%.

**RWPE-2.** La línea celular humana RWPE-2 fue derivada de la línea celular de epitelio prostático (RWPE-1), la cual fue transformada utilizando el virus del sarcoma murino de Kirsten (Ki-MuSV). Esta línea celular se cultivó en medio de cultivo de queratinocitos libre de suero suplementado con extracto de pituitaria bovina 0.05  $\text{mg}/\text{ml}$  y factor de crecimiento epitelial 5  $\text{ng}/\text{ml}$ . Los cultivos de esta línea celular fueron mantenidas a  $37^{\circ}\text{C}$  en un ambiente humidificado con  $\text{CO}_2$  al 5%.

## **12.2. Animales de experimentación.**

**Ratones.** BALB/c, BALB/c *Nude* (JaxTM Mice) CbyJ.Cg-Foxn1 nu/J se obtuvieron desde *Jackson Laboratory*, EEUU. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas y en un ambiente estéril. Los ratones de experimentación, fueron colocados en cajuelas individuales y con una alimentación y suministro de agua adecuada realizando una vigilancia de la salud de los animales de forma permanente. Para el sacrificio de animales se utilizó una inyección de cloruro de potasio (1,5  $\text{mmol}/\text{Kg}$  de peso) por vía intravenosa para evitar el sufrimiento de los animales.

**Huevos de *Gallus gallus domesticus*** . Se obtuvieron desde el instituto de salud publica (ISP, Chile). Los huevos se lavaron con una solución de sulfato de cobre 7  $\mu$ M para prevenir la contaminación con hongos, e incubaron a 37,5°C y una humedad relativa del 80 % durante 10 días. Los huevos se voltearon periódicamente con un volteador automático (GQF Hova-bator Manufacturing Co. EEUU) para prevenir la adhesión y ruptura de la membrana corioalantoidea (CAM) a la cáscara del huevo.

Todos los experimentos realizados en animales durante esta tesis fueron ejecutados de acuerdo a las recomendaciones de la guía de NIH (*National Institutes of Health*) para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*current edition, 2013*) y siguiendo las normativas indicadas en el manual chileno de bioseguridad de Conicyt. Los protocolos fueron revisados y aprobados por el comité institucional de Bioética de la Universidad de Concepción.

### **12.3. Obtención de LDL.**

La LDL se obtuvo desde plasma humano de sangre venosa de voluntarios sanos con ayuno estricto de 10 horas, utilizando como anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (EDTA, 1 mg/mL) y preservante de Alaupovic (ácido  $\epsilon$  aminocaproico 1M, EDTA 10%, glutatión 5%, penicilina 10000 U/mL, estreptomycin sulfato 1000  $\mu$ g/mL) en proporción 1:100. El plasma se separó de la sangre total por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cuál se formó un *pool* de plasma. El *pool* de plasma obtenido se sometió a ultracentrifugación diferencial con bromuro de potasio (KBr) (Chapman y col., 1981; Schumaker y Puppione, 1986) por ajuste de densidad

entre 1,019 y 1,063 g/mL, con lo cuál se aisló la fracción de LDL contenida en el plasma. El plasma de densidad 1,06 g/mL se centrifugó a 40000 rpm por 20 horas a 16°C. La fracción que contenía las VLDL y quilomicrones fue descartada y el infranadante se ajustó a densidad 1,063 g/mL con KBr según la fórmula:

$$gKBr = ([Df-Di] \times V) / (1-[Df \times 0.315]) , \text{ donde Df: Densidad final (g/mL)}$$

Di: Densidad inicial (g/mL)

V: Volumen de plasma (mL)

El infranadante fue centrifugado a 40000 rpm por 20 horas a 16°C, luego se extrajo la fracción rica en LDL. La fracción de LDL obtenida se sometió a diálisis exhaustivas en tampón fosfato salino PBS (NaCl 136 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM) pH 7,4 por 72 horas con recambio de 2 L de PBS cada 1 hora y 5 L durante la noche. Posteriormente, se filtró por membrana de nitrocelulosa (diámetro de poro 0,2 µm) y se guardó a 4°C protegida de la luz y una atmósfera de N<sub>2</sub> para prevenir su oxidación.

El contenido proteico de la fracción de LDL se determinó por el método de Lowry modificado para lipoproteínas, utilizando como patrón albúmina de suero de bovino (BSA). Se realizó una curva de calibración con BSA en concentraciones entre 100 y 500 µg/mL para establecer el rango lineal de detección. Los estándares y las muestras fueron diluidas en agua en un volumen final de 50 µL; se les adicionó 500 µL de reactivo de Lowry modificado (NaOH 0,8 N, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O 0,2%- tartrato de sodio y potasio 0,4%, SDS 10 % y se incubó

por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se adicionó 250  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 75% diluido 1/5 en agua destilada y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. La absorbancia de las muestras fue medida a  $\lambda$  750 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1001.

#### **12.4. Generación de LDL oxidada (oxLDL).**

La LDL fue dializada contra 2 litros de PBS (pH 7,4) durante 24 hrs con recambio de buffer cada 8 hrs. Luego, 1mg/ml proteína de LDL fue incubada en PBS 10 mM (pH 7,4) en presencia de  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu$ M a 37°C por 3 horas. La oxidación fue monitoreada en el tiempo a través de la formación de dienos conjugados por espectrofotometría a 243nm. La reacción de oxidación fue detenida agregando 2 mM de EDTA y 4,5  $\mu$ M de BHT (hidróxido butilado) la oxLDL fue mantenida a 4°C protegidas de la luz.

#### **12.5. Determinación del cambio de movilidad electroforética de la oxLDL.**

La correcta oxidación de las LDLs se analizó por el cambio de movilidad electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer barbital sódico 50 mM-HCl 0,1 M pH 8,6. 50  $\mu$ g de proteínas de LDL o oxLDL se sembraron en un gel de agarosa al 1% con buffer de carga (azul de bromofenol 0,03% y glicerol 50 %) y se resolvieron en buffer barbital sódico 50 mM-HCl 0,1 M pH 8,6 a un voltaje constante de 100 volt por 4 horas. Posteriormente el gel fue teñido con solución colorante (azul de *Coomassie* R- 250 0,1%, metanol 50%, ácido acético 10%) y el exceso de solución de tinción se removió con lavados sucesivos con una solución decolorante (metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v). Las imágenes del gel fueron registradas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR (Texas, EEUU) a  $\lambda$  790 nm.

### **12.6. Determinación de la concentración de malondialdehído MDA en oxLDL.**

Para conocer el grado de lipoperoxidación de oxLDL se determinó la concentración de malondialdehído mediante el método del ácido tiobarbitúrico. Se añadieron 0.1 mL de la muestra (LDL o oxLDL), 0,1 mL de tampón Tris-HCl (150 mM pH 7,1), 0,1 mL FeSO<sub>4</sub> (1 mM) y 0,1 mL de ácido ascórbico (1.5 mM) en un tubo de ensayo de vidrio, luego se añadió 0,6 mL H<sub>2</sub>O destilada para completar el volumen a 1,0 mL. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 15 minutos. A continuación, 1 mL de ácido tricloro acético (TCA 10% v/v) y 2 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0.375% p/v) se añadieron a la mezcla de reacción, los tubos se taparon y se incubaron durante 15 minutos en agua hirviendo. Luego se realizó centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. Las muestras se analizaron por espectrofotometría a  $\lambda$  532 nm. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción del complejo MDA-TBA ( $1,56 \times 10^5 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y los resultados se expresaron como nmoles de MDA/mg de proteína.

### **12.7. Construcción del vector plasmídico de transferencia lentiviral pLU6W.**

Para la construcción del vector pLCW/U6 se utilizó el promotor U6 procedente del vector retroviral pGFP-V-RS (Origene Technologies Inc. EEUU). El vector fue digerido con las enzimas de restricción *EcoR1* y *EcoRV* (New England Biolabs,UK) para liberar y obtener el promotor U6. El vector de empaquetamiento viral pLCW (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba) contiene todos los elementos necesarios para empaquetar un transcrito primario dentro de una partícula lentiviral. El vector fue digerido con la enzima *NheI* (New England Biolabs,UK), para obtener el fragmento correspondiente a la secuencia del promotor de citomegalovirus (CMV), la cual fue descartada, y otro fragmento de

mayor tamaño que contiene el esqueleto completo del vector sin el promotor CMV. Los fragmentos de interés (promotor U6 y vector pLCW) fueron extraídos desde un gel de agarosa al 1% y posteriormente fueron purificados con el kit de purificación (E.Z.N.A.® Gel Purification Kit, EEUU). Los extremos cohesivos de los fragmentos purificados fueron romados utilizando la enzima *Klenow* (New England Biolabs,UK). El subclonamiento del promotor U6 fue ligado en el vector pLW (vector sin promotor CMV) utilizando la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs,UK) a 16°C por 4 horas. El correcto subclonamiento fue analizado a través de la digestión con las endonucleasas de restricción *EcoR1* y *EcoRV* o *BamH1* y *Eco010I* (New England Biolabs,UK).

#### **12.8. Digestión de los vectores y purificación de los fragmentos.**

Se inició el subclonamiento realizando la digestión en paralelo de: 5 µg del plásmido pGFP-V-RS (Origene Technologies Inc.) a 37°C utilizando las endonucleasas de restricción *EcoR1* y *EcoRV* (10 Unidades de cada una de las enzimas) en tampón NEB3 y BSA 1 µg/mL en un volumen final de 100 µL. En paralelo 5 µg del plásmido pLCW fue digerido a 37°C utilizando la endonucleasa de restricción *NheI* (10 Unidades) en tampón NEB 2 en un volumen final de 100 µL. La correcta digestión de los plásmidos se comprobó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0.1% v/v. Los productos de cada ensayo de restricción fueron purificados desde un gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio al 0,1% para la visualización del DNA mediante el sistema de detección UVIsave HD5 Uvitec (Cambrige, U.K). Luego las bandas fueron cortadas y pesadas y se agregaron 3 volúmenes de *membrane binding solution* por 0,1 mg de banda y la muestra se calentó a 50°C por 10 minutos hasta la disolución completa del gel,

agitando ocasionalmente. La mezcla DNA/gel obtenida fue filtrada en una columna *SV Minicolumn* por centrifugación a 12000 rpm por 1 minuto. El ADN se lavó 2 veces con 700  $\mu$ L de *membrane wash solution* y se centrifugó a 16.000 rpm por 1 minuto. El DNA fue eluido en 30  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. La cuantificación de los productos de digestión se realizó mediante espectrofotometría a  $\lambda$  260 nm.

### **12.9. Construcción del vector plasmídico de transferencia lentiviral para expresión de shRNA contra LOX-1.**

Para el diseño de los shRNA contra el receptor LOX-1 se utilizó el servicio web shRNA explorer Genelink <http://www.genelink.com/sirna/RNAicustomorder.asp>. Se escogieron 3 shARNs específicos de 19 mer contra el ARNm de LOX-1. Se agregaron en cada una de las secuencias de los shRNA diseñados dos extremos cohesivos para las enzimas de restricción *Xma*I y *Xho*I (tabla 1). Los pares de secuencias de DNA codificantes de cada uno de los shRNA fueron sintetizados por la compañía *Integrated DNA Technologies* (IDT, EEUU). Los oligos fueron resuspendidos en agua de biología molecular a una concentración final de 1 mM. La fosforilación 20  $\mu$ M de cada uno de los oligos se realizó utilizando 10 unidades de T4 polinucleotido quinasa PNK en buffer PNK 1X T4 *Polynucleotide Kinase* (70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 5 mM DTT pH 7,6) con 0,1 mM de ATP. La mezcla fue incubada a 25°C por 30 minutos, posteriormente los pares de secuencia complementarios fueron hibridados con temperatura en baño de agua a 95 °C por 5 minutos, para luego dejar a temperatura ambiente por 1 hora. La correcta hibridación de los shRNA fue chequeada en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Se digirieron 5  $\mu$ g del vector pLU6W con las enzimas de restricción *Xma*I y *Xho*I en *CutSmart*® *Buffer* 1X por 3 horas. Luego el fragmento de interés (pLU6W

lineal) fue extraído desde un gel de agarosa al 1% con el *kit* para extracción desde gel (E.Z.N.A.® Gel *Purification Kit*). Luego el vector pLU6W lineal fue desforilado con Fosfatasa antártica (New England Biolabs, UK) en buffer fosfatasa 1X para ligar las secuencias codificantes de los shRNA al vector pLU6W con la enzima T4 DNA ligasa.

#### **12.10. Ligación de los fragmentos.**

El vector y el inserto purificados se mezclaron en una relación molar 1:3 con la T4DNA ligasa (1U) y el tampón de ligación 10X de la enzima, en un volumen final de 20  $\mu$ L, la reacción fue incubada a 4°C por 16 horas.

#### **12.11. Transformación de bacterias competentes.**

Diez microlitros (10  $\mu$ L) del producto de ligación se dializaron contra agua destilada en filtros de nitrocelulosa (0,025  $\mu$ m de 13 mm, Millipore) por 30 minutos. Para la transformación se utilizó el método de electroporación, se descongelaron en hielo 50  $\mu$ L de bacterias electro competentes *Echerichia. coli* Top 10 (invitrogene, EEUU), se mezclaron con 5  $\mu$ L de la reacción de ligación y se incubaron durante 5 min. Las bacterias se electroporaron en cubetas de 2 mm en el equipo *Micropulser* (BioRad, EEUU). Las bacterias electrotransformadas fueron incubadas con 300  $\mu$ L de medio LB por 1 hora en agitación constante a 37°C. Finalmente, las bacterias fueron plaqueadas en placas LB/Ampicilina (60  $\mu$ g/ $\mu$ L) e incubadas a 37°C por 16 horas. Las colonias crecidas en las placas fueron seleccionadas utilizando un asa redonda y se sembraron en 5 mL de medio LB con ampicilina, dejando las bacterias en agitación constante durante 12 horas a 37°C para ser purificadas a escala mini preparativa.

#### **12.12. Purificación de ADN plasmídico a escala mini preparativa.**

Un mililitro del caldo de cultivo que contiene las colonias crecidas desde la

transformación del producto de ligación fueron centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió mediante vórtex. Se resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ L de buffer P1 (liso-, RNasa 10 $\mu$ g/mL), hasta garantizar la mezcla total de las bacterias. Luego, se añadió 100  $\mu$ L de solución II P2 (NaOH+SDS), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente se agregó 100  $\mu$ L de solución III (KAc+HAc) y se mezcló fuertemente para luego incubar en hielo por 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min. Aproximadamente 300  $\mu$ L de sobrenadante fue colectado en un tubo cónico de 1,5 mL y se le añadió 1 volumen de isopropanol (aproximadamente 300  $\mu$ L) y la muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y el *pellet* de ADN se secó a temperatura ambiente para ser resuspendido en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de biología molecular.

#### **12.13. Análisis de colonias positivas para el producto de ligación (pLU6W/shRNA-LOX-1).**

Los ADNs obtenidos desde las purificaciones de ADN plasmídico a escala mini preparativa fueron digeridos de la siguiente manera: para el vector pLU6W/shARN(1) se digirió con la endonucleasa de restricción *Hind* III (1 unidad) en buffer de reacción NEB 2 por 3 horas (bandas esperadas: 3344 bp, 856 pb, 843 pb, 584 pb, 556 bp y 312 bp). Los vectores pLU6W/shARN (2) y (3) respectivamente, se digirieron con las endonucleasas de restricción *Eco*RI y *Eco*RV en buffer de reacción NEB 3 por 3 horas (bandas esperadas: 6052 pb y 419 pb) las colonias positivas para cada uno de los productos de ligación fueron seleccionadas y 1 mL de cada uno de los cada de cultivo fueron transferidos a un

matraz Erlenmeyer con 300 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de ampicilina y se incubó a 37° C con agitación durante 12 horas.

#### **12.14. Purificación de ADN plasmídico a escala masiva.**

La purificación de los plásmidos se realizó mediante el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). El contenido del Erlenmeyer se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 mL de solución P1, luego, se adicionó 10 mL de solución P2, se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 minutos a 25°C. Luego se les adicionó 10 mL de solución P3 y se mezcló por inversión. El frasco se incubó en hielo 15 minutos y pasado este tiempo se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El ADN purificado se precipitó con 0.8 volúmenes de isopropanol y se incubó por 10 minutos a 25°C. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm, durante 20 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%. El precipitado se resuspendió en 500 µL de agua grado biología molecular. El ADN purificado se incubó a 37°C con 20 µg/mL de ARNasa durante 30 minutos. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8% [p/v] para verificar que el plásmido no estuviese degradado o contuviese ARN. Las proteínas contaminantes se extrajeron con fenol/cloroformo, y el precipitado final se resuspendió en agua de grado de biología molecular y su concentración se obtuvo mediante espectrofotometría.

#### **12.15. Determinación de la eficiencia de silenciamiento de los plasmídios que median la expresión de los shRNA/LOX-1.**

Para determinar la eficiencia del silenciamiento de cada uno de los shRNA para LOX-1, se utilizó como modelo de estudio la línea celular estable HEK-293/LOX-1(+) la cual fue diseñada y generada en nuestro laboratorio para la sobre-

expresión del receptor LOX-1. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células HEK-293/LOX-1(+) con un 70% de confluencia fueron transfectadas con 2  $\mu\text{g}$  de DNA de cada uno de los tres vectores pLU6W shRNA LOX-1 generados, y se determinó la expresión de LOX-1 por PCR en tiempo real e inmunocitoquímica. Los 2 shRNA con mejor eficiencia de inhibición se seleccionaron para la generación de partículas lentivirales.

## **12.16. Generación de partículas lentivirales.**

### **12.16.1 Transfección de células HEK-293FT con polietilenimina.**

Se sembraron  $3 \times 10^6$  células HEK-293 FT en placas de  $100 \text{ cm}^2$  a una confluencia aproximada del 40% y se cultivaron en medio de crecimiento DMEM 10% de suero fetal bovino a  $37^\circ\text{C}$  con atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y humedad relativa del 95% hasta alcanzar una confluencia celular del 80%. Cuatro horas antes de comenzar la transfección se cambió el medio de crecimiento por medio DMEM y se continuó el cultivo en las condiciones anteriores. Ambos reaccionantes ADN y PEI se prepararon por separado, considerando la relación de 1  $\mu\text{L}$  de PEI por 1  $\mu\text{g}$  con de ADN. Para las placas de  $100 \text{ cm}^2$  se utilizó  $30 \mu\text{g}$  de DNA total por placa y el volumen final se ajustó a 100  $\mu\text{L}$  con solución de glucosa, se mezcló vigorosamente por 1 min y se dejó reposar a  $25^\circ\text{C}$  durante 10 min. Considerando la relación de 1  $\mu\text{L}$  de PEI por 1  $\mu\text{g}$  de ADN se tomó 30  $\mu\text{L}$  de PEI, y el volumen final se ajustó a 100  $\mu\text{L}$  con la solución de glucosa, se mezcló vigorosamente 1 minutos y se dejó reposar a  $25^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Pasado este tiempo se añadió el PEI al ADN e inmediatamente se mezcló vigorosamente durante 2 min para dejar reposar a  $25^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Durante estos 10 minutos las

células se lavaron 2 veces con PBS. Se adicionó medio DMEM a la mezcla de transfección y esta se añadió suavemente sobre la capa celular. El cultivo celular se incubó a 37°C durante 6 horas con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 95%. Posteriormente se añadió medio de crecimiento con suero fetal bovino al 20% sin extraer el medio anterior y en una proporción tal que la concentración final de SFB fuese ajustada al 10%. El cultivo se incubó a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de humedad relativa por 2 días.

#### **12.16.2. Producción y concentración de partículas lentivirales.**

Se generaron 2 partículas lentivirales: LvshRNA LOX-1 (A y B) y LvGFP para el silenciamiento de LOX-1 y como control de la producción de partículas lentivirales en las células HEK-293FT respectivamente. La producción de partículas lentivirales se realizó mediante la co-transfección de los vectores plasmídicos de empaquetamiento lentiviral (pLCWLOX1, pLCU6W/shRNA LOX-1 y pLGW) y los plásmidos ayudantes (pL1, pL2 y pVSVG) en la línea celular HEK-293FT, a una razón de 2:1:1:1 respectivamente. Para la generación de los vectores lentivirales LvshRNA/LOX-1 (A y B) y LvGFP la transfección se realizó en placas de cultivo adherente de 100 cm<sup>2</sup> utilizando como reactivo de transfección polietilenimina (PEI). Para la generación de las partículas lentivirales LvshRNA/LOX-1 (A y B), se utilizaron 12 µg/µL de pLU6W/shRNA LOX-1, y 6 µg/µL de cada plásmido ayudante. Para la generación de las partículas lentivirales LvGFP se utilizaron 12 µg/µL de pLGW y 6 µg/µL de cada plásmido ayudante. Por separado se mezcló 30 µg de PEI con glucosa, considerando la relación de 1 µL de PEI por 1 µg de ADN. Cada experimento de transfección se realizó con 10 réplicas en placas de 100

cm<sup>2</sup>. Como control de transfección para la generación de partículas lentivirales se utilizó 0,5 ug de plásmido pCMV/eGFP, en conjunto con la co-transfección. Pasadas 48 horas post transfección se colectó el medio de cultivo y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm y posteriormente las partículas lentivirales LvshRNA LOX-1 y LvGFP se concentraron mediante ultracentrifugación a 23000 rpm durante 1 hora y 30 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 50 µL de medio de cultivo, se alicuotó y se almacenó a -80°C.

### **12.17. Generación de líneas celulares estables de cáncer próstata a través de transducción lentiviral.**

#### **12.17.1. Transducción de células C4-2 con vectores lentivirales Lv-shRNA-LOX-1, Lv-GFP, Lv-shRNA control.**

Las células de cáncer de próstata C4-2 se cultivaron en placas de 96 pocillos hasta una confluencia celular del 60%, se incubaron con 5 µL de los vectores LvshRNA-LOX-1, LvGFP o Lv-shRNA control (*control shRNA Lentiviral Particles-A: sc-108080*, Santa Cruz, Biotechnology) durante 12 horas en medio RPMI sin suero. Luego de la incubación se retiró el medio de cultivo y se agregó RPMI con de suero fetal bovino al 10% hasta alcanzar confluencia celular en los días posteriores.

#### **12.17.2. Selección de clones mediante dilución celular.**

Las células transducidas con cada uno de los vectores lentivirales se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 1 célula por pocillo, el cultivo se mantuvo durante 30 días con medio RPMI y SFB al 10%. Las colonias de células individuales se identificaron mediante observación directa al microscopio óptico. Una vez alcanzada la confluencia las células se traspasaron a una placa de 24

pocillos y se generaron placas duplicadas para la identificación de los clones positivos y su posterior criopreservación. A partir de obtenidos los clones para silenciamiento de LOX-1 en las líneas de cáncer de próstata C4-2 se analizó la expresión de LOX-1 en los clones C4-2/shRNA-LOX-1, C4-2/shRNA-Control y C4-2/GFP mediante western blot, PCR en tiempo real e inmunocitoquímica.

### **12.17.3 Análisis de expresión del receptor LOX-1 mediante western blot en líneas celulares de cáncer de próstata y epitelio normal prostático.**

La expresión del receptor LOX-1 fue determinada por western blot en las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3, DU145, LNCaP, C4-2 y C4-2B, en la línea celular epitelial prostática transformada con el oncogen *ki-RAS* RWPE-2 y en la línea de epitelio normal prostático RWPE-1. Las células fueron crecidas según lo descrito en el ítem de cultivos celulares. Las proteínas totales de cada una de las líneas celulares ensayadas (30 µg) fueron sembradas y resueltas por SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) por 30 minutos a voltaje constante de 25 volt y un amperaje máximo de 0,3 amperes utilizando el equipo de transferencia *Trans-Blot Turbo, Transfer System* (Bio-Rad, EEUU), para luego ser bloqueadas con buffer de Bloqueo TBS 50 mM pH 7,5 leche descremada al 5% (p/v) por una hora. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal generado en ratón ox-LDLR-1/LOX19-22 (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) en un título de 1/1000 por 16 horas. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces por 5 minutos con buffer TBS 50 mM pH 7,5 más Tween-20 0,05%, para luego ser incubada en buffer de bloqueo con un anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón generado en burro conjugado a Alexa Fluor 680 en un título de 1/5000 (Jackson, EEUU). Como

control de carga se utilizó la inmunodetección de  $\beta$ -actina, con un anticuerpo anti-beta actina (C4) generado en ratón (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 790 (Jackson, EEUU). Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR (Texas, EEUU).

#### **12.18. Análisis de expresión del receptor LOX-1 en cáncer de próstata utilizando la base de datos de array públicas y Oncomine.**

La expresión de LOX-1 fue analizada desde la base de datos pública para la progresión tumoral de cáncer de próstata GDS2545 depositada en sitio web NCBI *Gene Expression Omnibus* (GEO) para cual posee 18 muestras de tejido prostático sano, 65 muestras de adenocarcinomas prostáticos y 25 muestras de metástasis de cáncer de próstata. Además la expresión de LOX-1 fue analizada en tres bases de datos de *microarray* para cáncer de próstata (Tomlins, Grasso, y Taylor) obtenidas desde Oncomine.

#### **12.19. Análisis del efecto de oxLDL en la expresión de marcadores proangiogénicos, marcadores de transición epitelio mesenquimal y LOX-1 en células de cáncer de próstata.**

##### **12.19.1. Tratamientos de células de cáncer de próstata con oxLDL.**

Se cultivaron 500.000 células de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y DU-145 en placas de 12 pocillos (Corning, EEUU) hasta una confluencia aproximada del 80%, en las condiciones de cultivo descritas anteriormente en el epígrafe cultivos celulares. Las células de cáncer de próstata fueron tratadas por 48 horas con 500  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI con SFB al 2,5 % el cual contenía oxLDL en

concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL. Como control se utilizó 500 µL de medio de cultivo 2,5% con 50 µL de PBS sin oxLDL.

### **12.19.2. Extracción de proteínas.**

El medio de cultivo de las células tratadas con oxLDL fue colectado y almacenado a -20°C en tubos cónicos de 1,5 mL para el estudio de actividad de metaloproteinasas y ensayos de angiogénesis en anillos aórticos. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS por 1 minuto para ser incubadas con 100 µL de buffer RIPA (ThermoFisher Scientific, EEUU) más *cocktail* de inhibidores de proteasas 1X (ThermoFisher Scientific, EEUU) durante 30 minutos a 4°C. El lisado celular fue resuspendido por pipeteos sucesivos y almacenado en tubos de 1,5 mL a -80°C. Las proteínas totales fueron cuantificadas en placas de 96 pocillos utilizando el método de Bradford con el reactivo *Pierce Coomassie Plus* (ThermoFisher Scientific, EEUU), siguiendo el protocolo indicado por el proveedor.

### **12.19.3. SDS-PAGE y Western Blot de fluorescencia.**

Se sembraron 30 µg de proteínas totales de las células tratadas con oxLDL y fueron resueltas por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% a un voltaje constante de 120 volt. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF *immobilon FL* 0,45 µm, utilizando el equipo de transferencia semi-seca *Trans-Blot Turbo, Transfer System* (Bio-Rad, EEUU), por 30 minutos a un voltaje constante de 25 Volt y un amperaje máximo de 0,3 amperes. Las membranas fueron bloqueadas con buffer de bloqueo TBS 50 mM pH 7,5 leche descremada al 5% (p/v) por una hora. Las membranas fueron incubada en buffer de bloqueo-Tween-20 0.05% v/v con un anticuerpo primario específico para cada uno de los marcadores de angiogénesis, transición epitelio mesenquimal, anticuerpo anti-LOX-1 (La descripción específica y

títulos utilizados para cada uno de los anticuerpos utilizados durante esta tesis se describen en la Tabla 2). Posteriormente la membrana fue lavada 3 veces por 5 minutos con buffer TBS 50 mM pH 7,5 -Tween-20 al 0,05% v/v, la membrana fue incubada en buffer de bloqueo con el anticuerpo secundario apropiado conjugados con Alexa Fluor 680 o 790 para su detección por fluorescencia infrarroja. Las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con buffer TBS 50 mM pH 7,5 - Tween-20 al 0,05% v/v y reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR (Texas, EEUU). El sistema de detección ODISSEY CLX de LI-COR contiene un sistema de excitación de dos laser y un sistema de detección de arreglo de diodos para dos longitudes de onda del infrarrojo (680 y 790 nm). Este sistema posibilita la detección simultanea de 2 proteínas en una misma membrana y además, el sistema de detección permite cada pixel de la imagen obtenida desde las membranas reveladas sean independientes entre ellos, evitando problemas de saturación y pérdida de señal presentes en los sistemas de detección de quimioluminiscencia y los revelados utilizando *films* fotográficos. La cuantificación de las intensidades de fluorescencia se realizaron utilizando el *software* ImageStudio, LICOR.

## **12.20. Análisis de la expresión relativa de marcadores de angiogénesis, transición epitelio mesenquimal y LOX-1 en células transfectadas con un siRNA contra LOX-1 y tratadas con oxLDL.**

### **12.20.1. Transfección de siRNA en células de cáncer de próstata.**

Se cultivaron 500.000 células de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y Du-145 en placas de 12 pocillos (Corning, EEUU) hasta una confluencia aproximada del 50%, en las condiciones de cultivo descritas anteriormente. El medio de cultivo RPMI

con SBF al 10% y antibióticos se removió de las células y se les agregó 500  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI mas SFB al 10% sin antibióticos. Las células se transfectaron con Lipofectamina 2000 utilizando el protocolo sugerido por el proveedor para transfección de siRNA. Cincuenta (50) picogramos de siRNA contra el receptor LOX-1 o siRNA control (Ambion, EEUU) se mezclaron con 60  $\mu$ L de medio de cultivo Opti-MEM (ThermoFisher Scientific, EEUU) y 1  $\mu$ L de Lipofectamina 2000 (ThermoFisher Scientific, EEUU) se mezcló con Opti-MEM por 5 minutos. Posteriormente, la mezcla siRNA/Opti-MEM se agregó a la mezcla Lipofectamina/Opti-MEM para ser resuspendidas por pipeteos sucesivos y reposadas por 20 minutos. Finalmente la mezcla final siRNA/lipofectamina se agregó sobre los cultivos celulares y las células se incubaron bajo condiciones normales de cultivo por 2 días. Para determinar que LOX-1 disminuye su expresión previo a los tratamientos con oxLDL se realizó extracción de ARN y proteína para determinar la expresión de LOX-1 por PCR en tiempo real y western blot en células de cáncer de próstata transfectadas con siRNA contra el receptor LOX-1. Una vez determinada la disminución de la expresión del receptor LOX-1, las células se trataron con oxLDL en concentraciones de 0, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL por un día.

#### **12.20.2. Extracción de ARN total.**

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit de extracción *Absolutely RNA® Miniprep Kit* de Stratagene. Para ello, aproximadamente 800.000 células fueron tripzinizadas, traspasadas a un tubo cónico de 15 mL y centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se descartó y se agregó una mezcla de 600  $\mu$ L de *buffer* de lisis más 4,2  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. Luego, se traspasaron 700  $\mu$ L del

homogeneizado a un *spin cup* con filtro y se centrifugó por 5 minutos a 15,000 rpm. Se agregó un volumen equivalente de etanol 70% al filtrado, se transfirieron 700  $\mu$ L de la mezcla a un *spin cup* de unión (*binding RNA*) y se centrifugó por 60 segundos a 15,000 rpm. Se agregó 600  $\mu$ L de tampón de baja salinidad y se centrifugó por 60 segundos a 15,000 rpm. Se agregaron 50  $\mu$ L de la solución ADNasa directamente a la matriz del *spin cup*, se incubó por 15 minutos a 37 °C. Luego, se agregó 600  $\mu$ L de tampón de alta salinidad y se centrifugó por 60 segundos a 15,000 rpm. Se transfirió el *spin cup* a un tubo cónico de 1,5 mL y se agregó 50  $\mu$ L de tampón de elución. Finalmente, se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 60 segundos a 15,000 rpm. La integridad del ARN se analizó en gel de agarosa al 2% para la identificación de las sub-unidades ribosomales 18S y 28S. La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría a una  $\lambda$  260/280 nm en equipo SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Alemania), los ARN fueron diluidos a una concentración de 50 ng/ $\mu$ L y almacenados a -80°C hasta su utilización.

### **12.20.3. Análisis de expresión relativa mediante PCR en tiempo Real de un paso.**

Para el análisis de expresión relativa se utilizó el Kit de PCR en tiempo real de un paso Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix 1-step (Agilent Technologies, EEUU). Las reacciones de PCR se realizaron según el protocolo sugerido por el proveedor utilizando 100 ng de RNA y 400 nM de *primers* por reacción de PCR. Todos los *primers*, ciclos, temperaturas y tiempos de cada uno de segmentos de la reacciones de retrotranscripción, PCR y *Melting* están indicados en la tabla 4. Las PCR fueron realizadas en el equipo AriaMx y analizadas con el software AriaMx1.0 (Agilent Technologies, EEUU) con el método del  $2^{\Delta\text{CT}}$  utilizando como normalizador  $\beta$ -actina o GAPDH.

### **12.21. Ensayos de angiogénesis en anillos aórticos de ratón.**

Ratones machos de aproximadamente 6 semanas de edad fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub>. Las aortas torácicas fueron disecadas y lavadas con PBS estéril. Luego, el tejido adiposo extra fue removido, los extremos fueron descartados para luego cortar anillos de aproximadamente 1 mm. Los anillos fueron depositados en placas de 96 pocillos las cuales contenían un capa de 30 µL de colágeno tipo 1 de rata a 4°C, no polimerizado. Una vez depositados los anillos se recubrieron con 50 µL de colágeno tipo 1 de cola de rata. La placa se incubó a 37 °C por 30 minutos y luego se agregó medio de cultivo Opti-MEM más 10 µL de medio condicionado concentrado desde cada uno de los tratamientos realizados con oxLDL y se incubó por 5 días. El medio de cultivo fue removido y los anillos aórticos fueron fijados con paraformaldeido al 4% por 15 minutos, los anillos fueron lavados 3 veces con PBS y permeabilizados con Tritón X-100 al 0,1% por 30 minutos. Posteriormente los anillos fueron lavados 3 veces con PBS e incubados con Faloidina-TexasRed (Invitrogene, EEUU). Los anillos se fotografiaron en el eje Z utilizando el microscopio confocal (Olympus IX83 DSU, EEUU) y el total de brotes de anillos aórticos se cuantificó utilizando el *software ImageJ*.

### **12.22. Ensayos de angiogénesis *ex vivo* en membranas corioalantoídeas de embriones de pollo.**

Los estudios de angiogénesis *in-vivo* se realizaron en membranas corioalantoídea (CAM) de embriones de pollo. Los huevos de *Gallus gallus domesticus* fueron lavados con agua autoclavada con CuSO<sub>4</sub>, secados y posteriormente incubados durante 10 días a 37,5 °C y 80 % de humedad y volteados periódicamente con el volteador automático dual (ovabater) para evitar la adhesión y ruptura de la CAM

con la cáscara del huevo (Dohle, Pasa et al. 2009). Las células de cáncer de próstata C4-2/shRNA control y C4-2/shRNALOX-1, se lavaron con PBS por 2 minutos y se disgregaron con tripsina 1X durante 5 minutos. Luego se adicionaron 8 mL de medio RPMI con SFB al 10% y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Una vez retirado el sobrenadante las células, fueron tratadas con o sin oxLDL a una concentración 100 µg/mL en PBS durante 1 hora. Paralelamente, los huevos con embriones de pollo de 10 días de desarrollo, se les generó una ventana para exponer la CAM, y con un hisopo de algodón se generó una pequeña injuria en donde se procedió a inocular  $1 \times 10^6$  células de cáncer de próstata, finalmente las ventanas de los huevos fueron cubiertas con cinta adhesiva de laboratorio y los huevos se incubaron a 37,5°C, 80% de humedad por cinco días. Posteriormente, los tumores fueron extraídos desde la CAM y se determinó el grado de vascularización tumoral utilizando registros fotográficos por medio del estereoscopio Olympus SZX16. Se determinó el número de vasos sanguíneos asociados a la masa tumoral con el software ImageJ.

### **12.23. Ensayo de agar suave o crecimiento celular independiente de anclaje.**

El crecimiento independiente de anclaje es la capacidad de las células transformadas para crecer de forma independiente a una superficie sólida y se relaciona con la capacidad tumorigénica de las células. Un método de estudio de este fenómeno es el ensayo de agar suave. Para cada condición estudiada se utilizaron placas de 35 mm las cuales fueron recubiertas con 1,5 mL de agarosa 0,5% en RPMI suplementado con L-glutamina 2mM, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 ug/ml) y suero fetal bovino al 10% y las placas fueron

mantenidas a 4°C. Posteriormente, se preparó agarosa al 0,35% en RPMI suplementado con suplementado con L-glutamina 2mM, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y suero fetal bovino al 10% con o sin oxLDL 100 µg/mL. La agarosa al 0,35% se mantuvo a una temperatura de 40°C y se adicionaron 15000 células de cáncer de próstata pre-tratadas con o sin oxLDL 100 ug/mL por 1 hora. Luego 1,5 mL del agar mezclado con células en suspensión se adicionó sobre la base de agar preparada anteriormente para luego incubarlas a 37°C por 14 días. Finalmente, las placas fueron teñidas con una solución de cristal violeta 0,005% (Sigma Aldrich, EEUU) por 3 horas. Las colonias fueron lavadas 3 veces con agua destilada y las colonias fueron contadas utilizando el estereoscopio Olympus SZX16.

#### **12.24. Zimograma para el análisis de la actividad gelatinasa de metaloproteínas en medio de cultivo de células tratadas con oxLDL.**

Para el análisis de la actividad de las metaloproteinasas de matriz, se colectó el medio de cultivo de las células de LNCaP, C4-2 y DU-145 tratadas con oxLDL por 48 horas. Las proteínas del medio de cultivo condicionado se cuantificaron por el método de Bradford. Se sembraron 30 ug de proteínas totales sin denaturar en un gel de poliacrilamida (10%) al 0,1% de gelatina. Las proteínas se separaron por 120 min a 100v. Posteriormente, el gel se lavó con una solución 2,5% Tritón 100X (Sigma-Aldrich, EEUU) por 45 minutos. El gel fue depositado en tampón de incubación (Tris HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaN<sub>3</sub> al 0.02% pH 8.0 ) a 37°C por 18 horas. Posteriormente, el gel se tiñó con Azul de Comassie por 10 minutos y se lavó con solución de destinción (ácido acético al 10%, metanol al 10% en agua). La actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 se evaluó en función

del tamaño de la banda obtenida de la degradación de la matriz de gelatina. El revelado del gel se documentó utilizando el equipo ODYSSEY® CLX con filtros de excitación/emisión para la detección en infrarrojo a  $\lambda$  700 nm.

#### **12.25. Inmunocitoquímica.**

Las células de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y DU-145 fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia. Aproximadamente 300.000 células fueron sembradas sobre vidrio recubiertos con fibronectina en placas de 24 pocillos hasta obtener una confluencia aproximada del 80%. Luego las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de oxLDL por 48 horas. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con buffer de NaCl (150 mM) por 10 minutos, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 minutos a 37°C, lavadas 3 veces con Tris-fosfato 1X (pH 7,4) por 10 minutos, permeabilizadas con Triton-X 100 al 1%, para luego ser bloqueadas con BSA al 1% p/v por 1 hora. La incubación con anticuerpos primarios se realizó en buffer de bloqueo BSA al 1% (los anticuerpos y títulos utilizados para los estudios de inmunocitoquímica se indican en la tabla 3). Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con Tris-fosfato por 10 minutos e incubadas con los anticuerpos secundarios apropiados. Las células fueron lavadas 3 veces con Tris-fosfato 1X por 10 minutos e incubadas con Faloidina-TexasRed para la tinción del citoesqueleto de actina. Finalmente las células fueron montadas sobre un portaobjeto usando VectaShield Hard Set con Dapi (Vector Laboratories, EEUU).

#### **12.26. Invasión celular o ensayo de curación de la herida.**

Los ensayos de invasión celular se realizaron a través del “ensayo de curación de la herida”. En placas de 24 pocillos pre-tratadas con fibronectina (Gibco, EEUU) se

depositaron anillos de clonamiento en la región central de la placa. Aproximadamente 200.000 células de cáncer de próstata fueron sembradas en la porción externa del anillo de clonamiento y 150.000 células fueron sembradas en la región central del anillo. Luego de 24 horas los anillos de clonamientos fueron removidos para obtener una región sin células la cual fue utilizada para realizar el ensayo. Antes de comenzar el ensayo se tomaron registro fotográficos utilizando el microscopio Olympus IX83 DSU. Posteriormente las células fueron tratadas con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de oxLDL por 48 horas, luego de lo cual se tomaron nuevamente registros fotográficos y se determinó el número de células que lograron invadir la región sin células.

#### **12.27. Ensayo de transmigración celular.**

Para los ensayo de transmigración celular se utilizaron *transwells* con un diámetro de poro de 8  $\mu\text{m}$  (costar, EEUU). Se sembraron aproximadamente 50.000 células de cáncer de próstata en los pocillos superiores del *transwell* en medio RPMI suplementado suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina–streptomycin al 1%. Luego de 24 horas las células fueron incubadas con oxLDL 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio RPMI con suero bovino fetal al 2,5% durante 48 horas. Los *transwells* fueron retirados de la placa y depositados en una placa sin medio de cultivo, las células de la parte superior del *transwell* fueron removidas con un hisopo de algodón, posteriormente las células de fijaron en etanol 75% v/v por 15 minutos. Luego, los *transwells* fueron secados e incubados con una solución de cristal violeta al 0,2 % por 15 minutos, se lavó 3 veces con agua destilada y se observó por microscopía el total de células que logran transmigrar a la parte inferior del *transwell*.

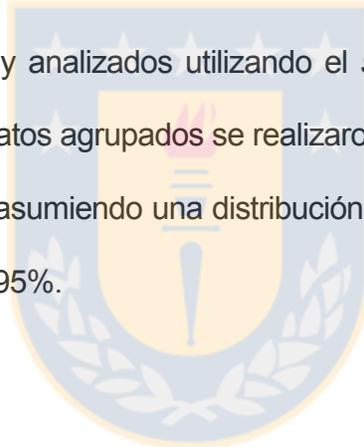
#### **12.28. Ensayos de xenograft subcutáneos en ratones nude.**

Células de cáncer de próstata fueron cultivadas hasta una confluencia del 80%,

posteriormente las células fueron tripsinizadas y cuantificadas en cámara de Neubauer.  $1 \times 10^6$  células fueron resuspendidas en 200 matrigel 50% v/v en medio de cultivo RPMI (B&D, EEUU) y mantenidas en hielo hasta ser inoculadas en los ratones. Ratones *nude* fueron anestesiados con isoflurano y luego se les inyectaron 200 uL de una suspensión de matrigel/RPMI mas  $1 \times 10^6$  células de cáncer de próstata C4-2/shRNA control en la región dorsal superior derecha y  $1 \times 10^6$  en la región dorsal superior izquierda del mismo ratón. Los animales fueron mantenidos durante 5 semanas para analizar posteriormente el tamaño, masa y volumen del tumoral.

### **12.29 Análisis de datos**

Los datos fueron graficados y analizados utilizando el *software* Graphpad Prism 5.0. Los análisis estadísticos de datos agrupados se realizaron mediante un test de ANOVA y un post test de Bonferroni, asumiendo una distribución no-paramétrica de los datos y un intervalo de confianza del 95%.



**Tabla 1. Secuencias codificantes de shRNAs contra el receptor LOX-1**

shRNA1	5' - <b>TCGAG</b> AACAAGCAGAAGAAGCTTCACAGT <b>CAAGAGCTGTGAAGCTTCTTCTGCTTGTTTTTTTC</b> - ' 3 ' 3 - <b>CTTGTT</b> CGTCTTCTTCGAAGTGTC <b>AGTTCTCGACACTTCGAAGAAGACCAACAAAAAAGGGCC</b> - ' 5
shRNA2	5' - <b>TCGAG</b> AATGGAACCTCACACCAGAATCTCAAGAGGATTCTGGTGGTGAAGTCCATTTTTTTTC - ' 3 ' 3 - <b>CTTACCT</b> TGAAGTGGTGGTCTTAGAGTTCTCCTAAGACCACCCTTCAAGGTAAAAAAGGGCC - ' 5
shRNA3	5' - <b>TCGAG</b> AAGACTGGATCTGGCATGGAGAATCAAGAGTTCTCCATGCCAGATCCAGTCTTTTTTTTC - ' 3 ' 3 - <b>CTTCTGACCT</b> AGACCGTACCTCTTAGTTCTCAAGAGGTACGGTCTAGGTCAGAAAAAAGGGCC - ' 5
shRNA4	5' - <b>TCGAG</b> AATAGCACAGCTGATCTGGACTTTC AAGAGAAGTCCAGATCAGCTGTGCTATTTTTTTTC - ' 3 ' 3 - <b>CTTATCGT</b> TCGACTAGACCTGAAAGTTCTCTCAGGTCTAGTCGACACGATAAAAAAAGGGCC - ' 5
shRNA5	5' - <b>TCGAG</b> ATACAACGAGGAGCTGTTTATGCTCAAGAGGCATAAACAGCTCCTCGTTGTATTTTTTTTC - ' 3 ' 3 - <b>CTATGTT</b> GCTCCTCGACAAATACGAGTTCTCCGTATTGTGTCGAGGAGCAACATAAAAAAAGGGCC - ' 5

Las secuencias para la enzima de restricción *Xma*I se presentan de color rojo y verde para la *Xho*I.



**Tabla 2. Anticuerpos y títulos utilizados para análisis de expresión mediante western blot.**

<b>Anticuerpo Primarios</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Código</b>	<b>Especie</b>		<b>Título</b>
<b>Anti-GAPDH (6C5)</b>	Milipore	CB1001	ratón	monoclonal	1/5000
<b>Anti-β-actina (AC-15)</b>	Santa Cruz	sc-816	ratón	monoclonal	1/5000
<b>Anti-E-cadherina (G-10)</b>	Santa Cruz	sc-8426	ratón	monoclonal	1/1000
<b>Anti-vimentina (C-20)</b>	Santa Cruz	sc-7557	cabra	policlonal	1/1000
<b>Anti-plakoglobina (H-80)</b>	Santa Cruz	sc-7900	conejo	policlonal	1/1000
<b>Anti-MMP-2 (H76)</b>	Santa Cruz	sc-10736	conejo	policlonal	1/1000
<b>Anti-MMP-9 (M17)</b>	Santa Cruz	sc-6841	cabra	policlonal	1/1000
<b>Anti-VEGF (C1)</b>	Santa Cruz	Sc-7269	ratón	monoclonal	1/1000
<b>Anti-LOX-1/OLR1</b>	R&D	AF1798-sp	cabra	policlonal	1/1000
<b>Anti-oxLDL R-1 (LOX19-22)</b>	Santa Cruz	sc-66155	ratón	monoclonal	1/1000

<b>Anticuerpo Secundarios</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Título</b>
<b>Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa fluor® 680</b>	Jackson	715625150	burro	1/5000
<b>Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa fluor® 790</b>	Jackson	715655150	burro	1/5000
<b>Anti-IgG de conejo (H+L) Alexa fluor® 680</b>	Jackson	711625152	burro	1/5000
<b>Anti-IgG de conejo (H+L) Alexa fluor® 790</b>	Jackson	711655152	burro	1/5000
<b>Anti-IgG de cabra (H+L) Alexa fluor® 680</b>	Jackson	705625147	burro	1/5000
<b>Anti-IgG de cabra (H+L) Alexa fluor® 790</b>	Jackson	705655147	burro	1/5000

**Tabla 3. Anticuerpos y títulos utilizados para inmunocitoquímica**

<b>Anticuerpo Primarios</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Código</b>	<b>Especie</b>		<b>Título</b>
<b>Anti-E-cadherina (G-10)</b>	Santa Cruz	sc-8426	ratón	monoclonal	1/100
<b>Anti-vimentina (C-20)</b>	Santa Cruz	sc-7557	cabra	policlonal	1/100
<b>Anti-LOX-1/OLR1</b>	R&D	AF1798-sp	cabra	policlonal	1/100
<b>Anti-oxLDL R-1 (LOX19-22)</b>	Santa Cruz	sc-66155	ratón	monoclonal	1/100

<b>Anticuerpo Secundarios</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Título</b>
<b>Anti-IgG de ratón (H+L) FITC</b>	Jackson	715097003	burro	1/1000
<b>Anti-IgG de Cabra (H+L) Cy3</b>	Jackson	705167003	burro	1/1000
<b>Anti-IgG de Cabra (H+L) Cy3</b>	Jackson	705097003	burro	1/1000



Tabla 4. Secuencia de los partidores utilizados para los análisis de expresión mediante PCR en tiempo real y esquema de perfiles térmicos para PCR en tiempo real de un paso.

Gen	Secuencia sentido 5'-3'	T <sub>m</sub> °C	Secuencia antisentido 5'-3'	T <sub>m</sub> °C
<b>LOX-1</b>	AGATCCAGACTGTGAAGGACCAGC	63	CAGGCACCACCATGGAGAGTAAAG	62
<b>E-cadherina</b>	CCTGGGACTCCACCTACAGA	62	TGGATTCCAGAAACGGAGGC	62
<b>N-cadherina</b>	CAGTATCCGGTCCGATCTGC	62	CATATGGTGGAGCTGTGGGG	62
<b>vimentina</b>	CCGGGAGAAATTGCAGGAGGAG	62	AGGTCAAGACGTGCCAGAGAC	62
<b>plakoglobina</b>	GACGGGCGCAAAGATGGTG	62	TGCTCTCCTGGTTGCCGTAG	62
<b>MMP-2</b>	GCCTGAGCTCCCGAAAAGA	62	GGGTGCTGGCTGAGTAGATCC	62
<b>MMP-9</b>	TGGTTCAACTCACTCCGGGAAC	62	TGGTTCAACTCACTCCGGGAAC	62
<b>VEGF</b>	CTGCTCTACCTCCACCATGC	62	AGCTGCGCTGATAGACATCC	62
<b>Snail</b>	CGCGCTCTTTCTCGTCAGG	62	GTCGTAGGGCTGCTGGAAGG	62
<b>slug</b>	GACCCCATGCCATTGAAGC	62	CGCAGTGCAGCTGCTTATGT	62
<b>twist</b>	GCTACGCCTTCTCGGTCTGG	62	ACATCTAGGTCTCCGGCCCT	62
<b>Zeb1</b>	GTGTTACCAGGGAGGAGCAGT	62	AGCTTCAGGCCCCAGGATTT	62
<b>β-actina</b>	TGTACCCTGGCATTGCCGACAG	62	ACGGAGTACTTGGCTCAGGAG	62

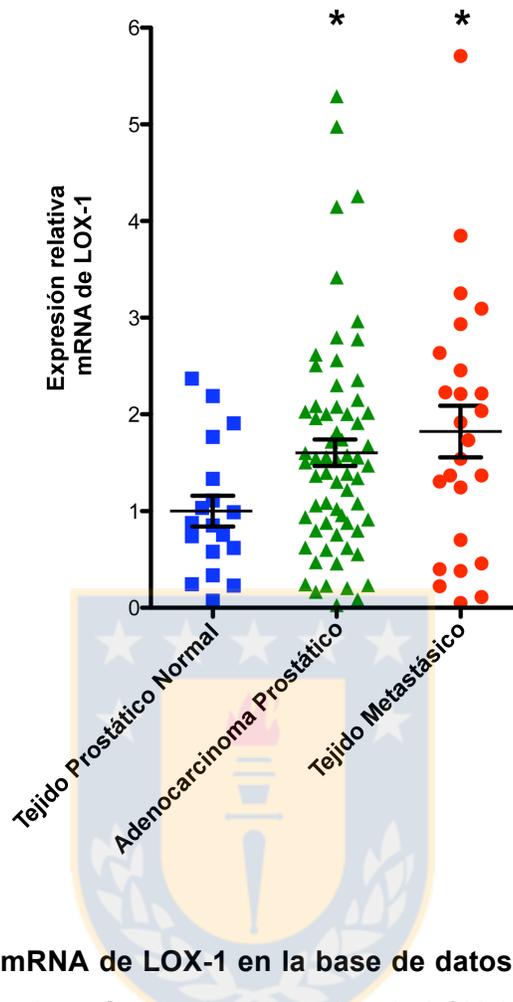


## 13.- RESULTADOS

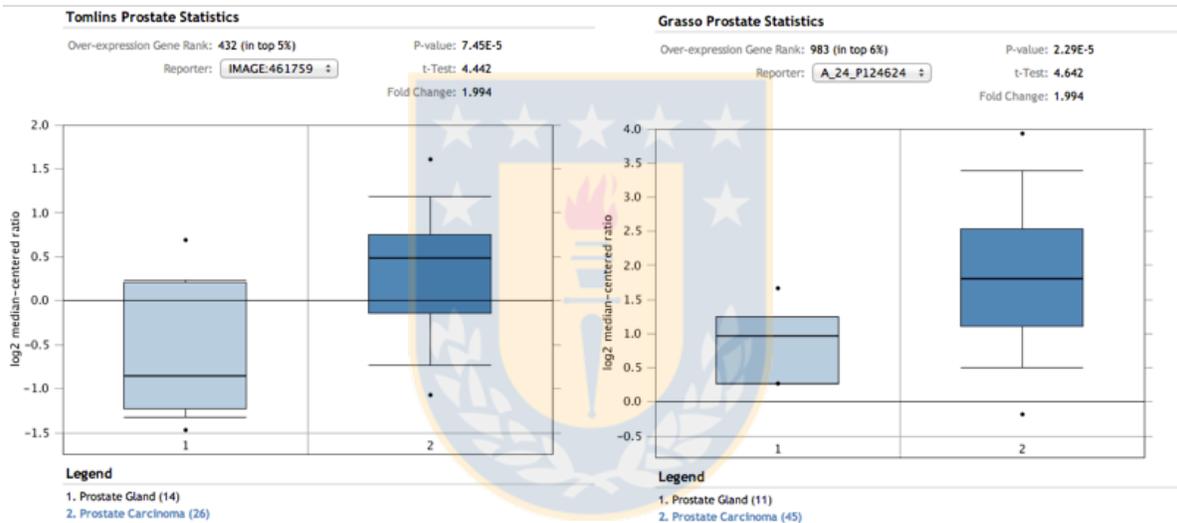
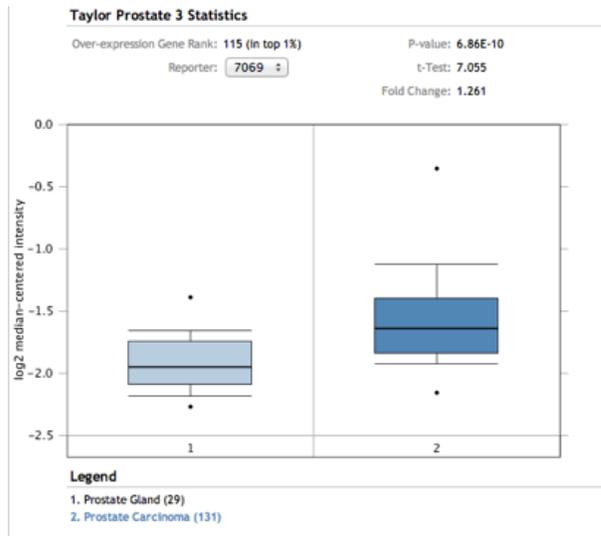
### **13.1. Resultados objetivo 1. Determinar los niveles de expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares de cáncer de próstata y generar modelos celulares con expresión reducida de este receptor.**

#### **13.1.1. El mRNA para LOX-1 está sobre-expresado en carcinomas prostáticos humanos.**

Con la finalidad de determinar si los resultados obtenidos mediante western blot para la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata se replica en pacientes con cáncer de próstata analizamos la expresión del mRNA de LOX-1 en la base de datos de *microarray* públicos para la progresión tumoral del cáncer de próstata GDS2545, depositada en sitio web NCBI Gene Expresión Omnibus (GEO). Esta base de datos muestra un análisis comparativo de tumores metastásicos, tumores primarios y tejidos prostáticos sanos. En este contexto, determinamos que la expresión de LOX-1 se encuentra aumentada significativamente en los tumores primarios y en metástasis del cáncer de próstata comparada con el tejido prostático normal (figura 7). Además, respaldando esta data (GDS2545) analizamos la expresión de LOX-1 en otras tres bases de datos de cáncer de próstata (Tomlins, Grasso, y Taylor) depositadas en el sitio web de ONCOMINE. Determinamos que la expresión de LOX-1 se encuentra aumentada significativamente en carcinomas prostáticos humanos respecto al tejido prostático normal (figura 8), respaldando lo observado para la expresión de LOX-1 en las líneas celulares de cáncer de próstata previamente analizadas.



**Figura 7. Expresión del mRNA de LOX-1 en la base de datos de *array* públicos para la progresión del cáncer de próstata.** La expresión de LOX-1 se determinó en la base de datos para progresión tumoral de cáncer de próstata GDS2545 depositada en sitio web NCBI Gene Expression Omnibus (GEO).



**Figura 8. Expresión del mRNA para LOX-1 en tres bases para cáncer de próstata obtenidas desde ONCOMINE.** La expresión de LOX-1 se determinó en las bases de datos de Tomlins, Grasso, y Taylor depositadas en sitio web de ONCOMINE.

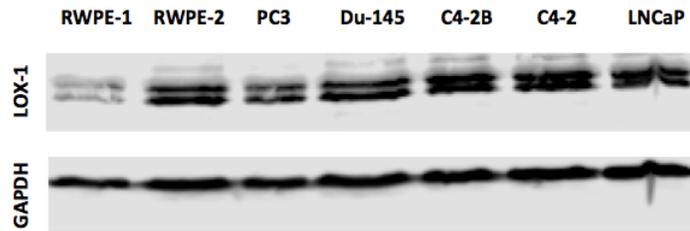
### **13.1.2. El receptor LOX-1 está sobre-expresado en células de cáncer de próstata humanas.**

La expresión del receptor LOX-1 en células de cáncer de próstata se analizó mediante western blot utilizando extractos de proteínas totales de las líneas celulares PC-3, DU-145, LNCaP, C4-2, C4-2B, la línea celular de epitelio prostático transformada con el oncogen ki-RAS (RWPE-2) y en la línea de epitelio normal prostático RWPE-1. Se determinó que todas las líneas de cáncer de próstata sobre-expresan la pro-forma de 30 kDa y la forma madura de 34 kDa del receptor LOX-1, con incrementos de PC-3: 3.7 veces, DU145: 3.3 veces, LNCaP: 1.6 veces, C4-2: 3.2 veces, C4-2B: 3.4 y RWPE-2: 3.0 veces, respecto a línea de epitelio normal prostático RWPE-1 (figura 9).

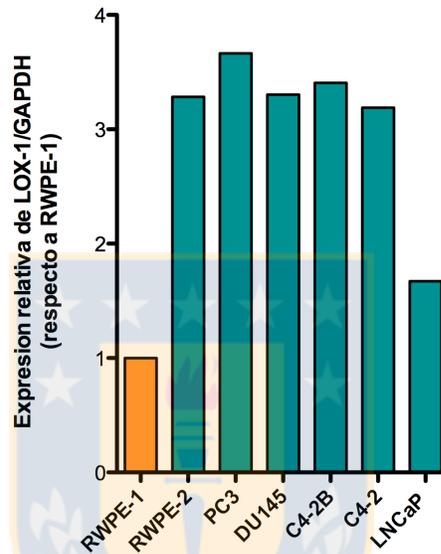
### **13.1.3. La oxLDL incrementa la expresión del receptor LOX-1.**

Estudios previos demostraron que las concentraciones de oxLDL se encuentran incrementadas en pacientes obesos y que estas inducen la expresión del receptor LOX-1. Además, se determinó que pacientes obesos con cáncer de próstata poseen un mayor riesgo en el desarrollo de carcinomas con mayor grado de malignidad o un mayor número de metástasis [126-128]. Para determinar si la oxLDL induce la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata analizamos su expresión frente al tratamiento con concentraciones crecientes de oxLDL en las líneas celulares LNCaP, C4-2 y DU-145. Demostramos que la oxLDL induce un aumento significativo en la expresión de LOX-1 dependiente de las concentraciones de oxLDL utilizadas. De esta manera, determinamos que la expresión de LOX-1 en las líneas celulares LNCaP, C4-2 y DU145 tratadas con las concentraciones mas altas de oxLDL (100 µg/mL), incrementa en 1.5, 2.5 y 3.9 veces, respectivamente, en comparación con el control sin tratamiento (figura 10).

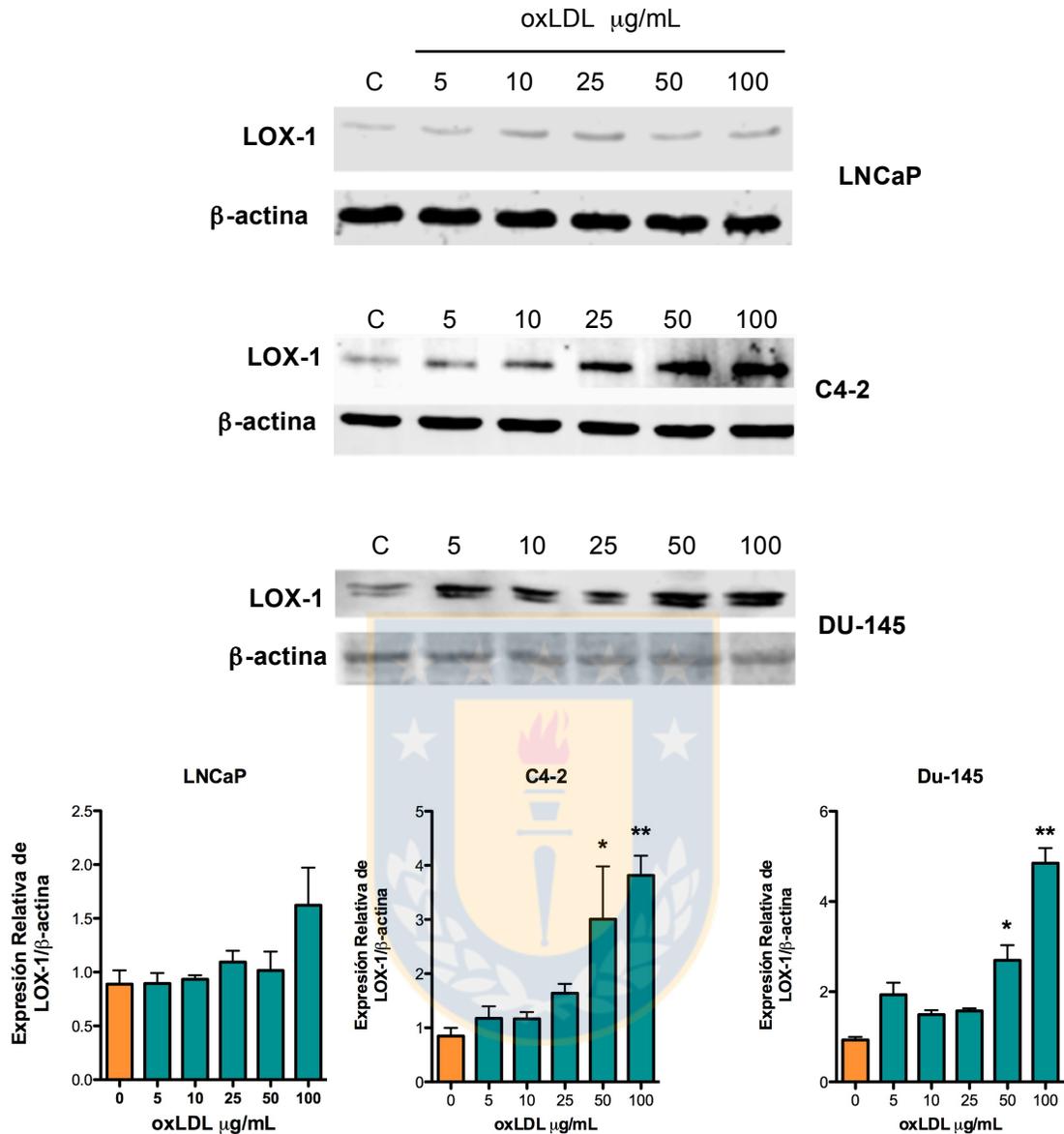
A



B



**Figura 9. Análisis de la expresión de LOX-1 en las líneas de celulares de cáncer de próstata y epitelio normal prostático.** La expresión del receptor LOX-1 se determinó por western blot en las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3, DU145, LNCaP, C4-2 y C4-2B, en la línea celular epitelial prostática transformada con el encogen ki-RAS (RWPE-2) y en la línea de epitelio normal prostático RWPE-1. Para la inmunodetección de LOX-1 se utilizó el anticuerpo monoclonal ox-LDLR-1/LOX19-22 y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 680. La inmunodetección de GAPDH se realizó con un anticuerpo anti-GAPDH humano y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR. B) La gráfica representa la cuantificación relativa de la densidad de banda de LOX-1 normalizada por GAPDH.



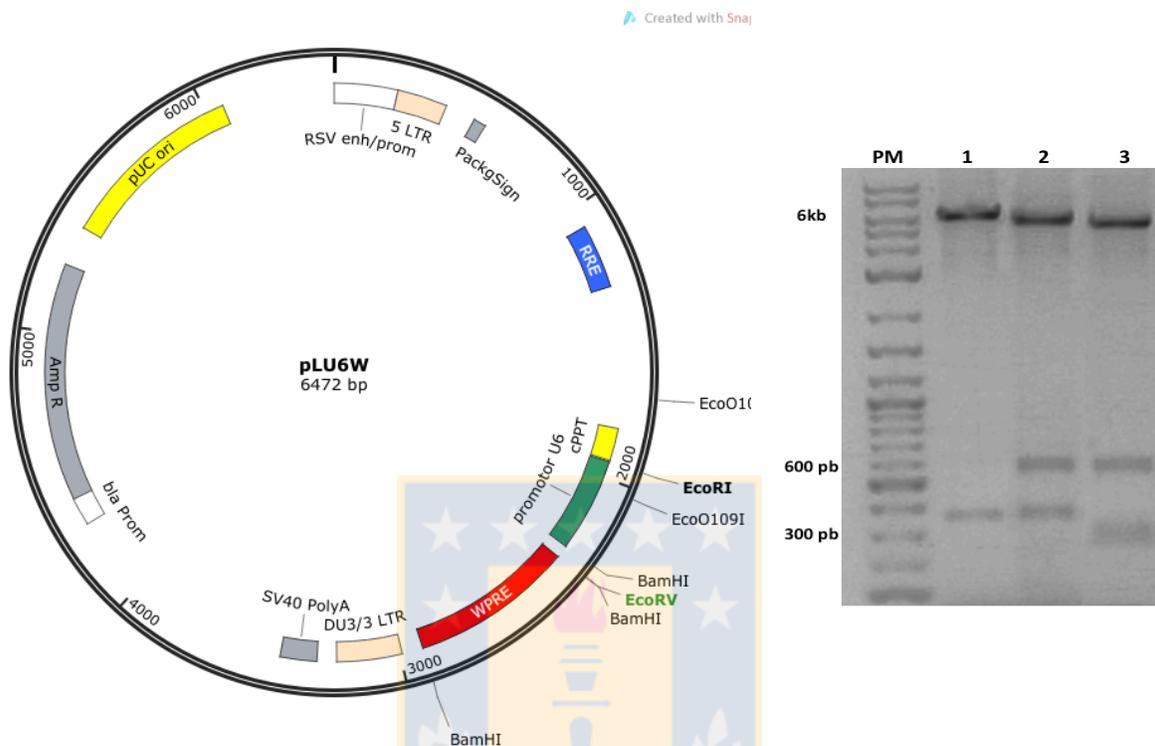
**Figura 10. Expresión de LOX-1 en células DU-145, C4-2 y LNCaP expuestas a concentraciones crecientes de oxLDL.** Las células DU-145, C4-2 y LNCaP se incubaron con oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL) por 48 horas. Posteriormente, se analizó por western blot la expresión de LOX-1 utilizando el anticuerpo monoclonal ox-LDLR-1/LOX19-22 y el anticuerpo monoclonal anti β-actina. Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 680 conjugados y anticuerpos secundarios anti IgG de cabra conjugado a Alexa Fluor 790. La gráfica representa las medias de las densidades de banda de LOX-1 normalizada por β-actina ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

#### **13.1.4. Construcción del vector pLU6W.**

El promotor U6 para la RNA polimerasa III se obtuvo mediante digestión enzimática desde el plásmido retroviral pGFP-V-RS utilizando las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. El plásmido lentiviral pLCW se digirió con la enzima de restricción *NheI* para descartar el promotor de citomegalovirus (CMV). Ambos fragmentos de DNA, promotor U6 y el plásmido pLCW sin promotor CMV, se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se romaron con la polimerasa de cadena simple *klenow*. El fragmento de ADN de 333 pb correspondiente al promotor U6 se clonó en el plásmido lentiviral pLCW (6138 pb), y se obtuvo como resultado un vector lentiviral de 6471 pb, denominado pLU6W. El vector recombinante derivado de este paso de clonación se identificó mediante análisis de restricción con las endonucleasas *EcoRI-EcoRV*, *EcoRI-BamHI* y *EcoR0109I-BamHI* y se corroboró mediante secuenciación (figura 11 y 12).

#### **13.1.5. Construcción de un plásmido de transferencia lentiviral para la expresión de un shARN contra el receptor LOX-1.**

El vector pLU6W se digirió con las endonucleasas *XmaI* y *XhoI* para obtener el vector lineal de 6457pb. El fragmento de interés (pLU6W lineal) se purificó desde un gel de agarosa. Posteriormente, cinco shARNs diseñados específicamente contra el ARNm de LOX-1 fueron hibridados, obteniéndose las secuencias codificantes de DNA doble cadena para cada shARN.



**Figura 11. Generación de vector de transferencia lentiviral pLU6W.** El vector lentiviral pLU6W se construyó a partir del promotor U6 del vector pGFP-V-RS y el vector pLCW sin el promotor de CMV. El vector recombinante resultante del clonamiento corresponde a un plásmido de 6471 pb el cual posee el promotor U6 para la síntesis de shRNAs corriente arriba del sitio de multiclonamiento. El vector pLU6W conserva todos los elementos del vector pLCW necesarios para empaquetar un transcrito primario dentro de una partícula lentiviral. Los análisis de restricción muestran el correcto clonamiento del vector pLU6W. Carril nº1 vector pLU6W digerido con *EcoRI*–*EcoRV* (bandas esperadas: 6099 pb y 372 pb), Carril nº2 vector pLU6W digerido con *EcoRI*-*BamHI* (bandas esperadas: 5498 pb, 595 pb y 377 pb). Carril nº3 vector pLU6W digerido con *EcoRI*-*BamHI* (bandas esperadas: 5262 pb, 595 pb, 327pb y 286 pb).

```

Promotor U6      1>-----* * * * * * * * * * *
pLU6W           416<AAAACAATTACAAAATTCAAAATTTGCTAGAAATCCCCAGTGGAAAGACGCGCAGGCAAACGCACCACGTGACGGAGCGTGACCGCGCCGAGCG>68

Promotor U6      69>cgcgccaaggtcgggcaggaagagggcctatttcccatgattcctcatatttgcataatagcagataaattagaattaattga>168
pLU6W           316<CGCGCCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGA<217

Promotor U6      169>ctgtaaacacaaaagatattagtacaaaatcgtgacgtagaaagtaataatttctgggtagtttgcagttttaaattatgttttaaatggactatca>268
pLU6W           216<CTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGGTAGTTGCAGTTTAAAATTATGTTTTAAATGGACTATCA<117

Promotor U6      269>tatgcttaccgtaacttgaagatatttgcatttctgggttatatatcttggaaaggacgcgggat-----cc----->339
pLU6W           116<TATGCTTACCGTAACTTGAAGTATTTGAGTCTTGGGTTTATATATCTTGGAAAGGACGCGGGATTTAAACCTCGAGACTAGTTGGCCACCGGGG<17

Promotor U6      339>-----* *----->339
pLU6W           16<CTTGAAGCAATTAAT<1

* Matches: 338; _ Mismatches: 0; - Gaps: 377

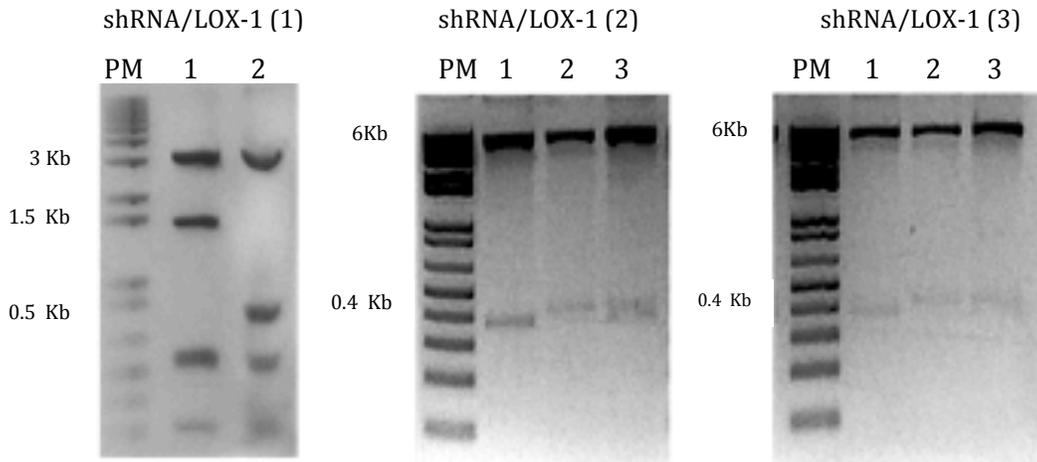
```

**Figura 12. Secuenciación del vector de transferencia lentiviral pLU6W y alineamiento con la secuencia de promotor U6.** El vector de transferencia lentiviral pLU6W fue secuenciado utilizando el Primer U6F. Para determinar el correcto subclonamiento del promotor U6 en el vector plasmidial pLCW las secuencia obtenidas de la secuenciación del vector resultante pLU6W fueron alineadas con la secuencia del promotor U6 utilizando el software Serial Cloner 2.0. La figura muestra el correcto alineamiento de las secuencias del promotor U6 con el vector pLU6W predicho *in silico*.

Las secuencias de ADN para el shARN (1), shARN (2) y shARN (3) de 65pb se clonaron en el vector pLU6W, y los vectores recombinantes derivados de este paso se identificaron mediante análisis de restricción y secuenciación (Figura 13 y 14). Para corroborar el clonamiento del shARN (1) se utilizó la endonucleasa de restricción *HindIII*, confirmándose un clonamiento correcto de acuerdo al patrón de bandas esperadas. En el caso de los shARN (2) y (3) al no existir un sitio de restricción distintivo, la forma de corroborar el clonamiento fue observar la diferencia de 60 pb en el tamaño de las bandas de los plásmidos digeridos. Para esto se utilizaron los productos del ensayo de restricción del vector pLCU6W vacío y pLU6W/shARN-LOX-1 con endonucleasas *EcoRI* y *EcoRV*. Se observó una diferencia entre las dos bandas, donde el plásmido que integró la secuencia de DNA, que expresa para shARN contra LOX-1, tiene un tamaño de 419 pb y el que no lo integró presenta una banda de 372 pb. El clonamiento correcto de los shARN (1), (2) y (3) respectivamente en el vector pLU6W fueron corroborados mediante secuenciación, demostrando la correcta construcción de los vectores plasmidiales.

#### **13.1.6. Análisis funcional de los vectores plasmidiales pLU6W/shARN-LOX-1.**

Para determinar la funcionalidad en el silenciamiento de LOX-1 de cada uno de los plásmidos generados, se utilizó la línea celular estable HEK-293/LOX-1(+), que expresa de forma constitutiva el receptor LOX-1. Cada uno de los plásmidos generados fueron co-transfectados con el plásmido pLGW (el cual codifica para GFP) en las células HEK-293/LOX-1(+). Se apreció una alta tasa de transfección de los 3 constructos plasmidiales co-transfectados (figura 15B).



**Figura 13 . Construcción de los vector plasmidiales pLU6W/shARN LOX-1.** Análisis de restricción que muestra el correcto clonamiento de la secuencia de ADN que codifica para el shARN (1) contra LOX-1 en el vector plasmidial lentiviral pLU6W. Carril 1: vector pLU6W digerido con *Hind*III (bandas esperadas: 3344bp, 1675pb, 584pb, 556bp y 312bp), carril 2: vector pLU6W/shARN (1) digerido con *Hind*III (bandas esperadas: 3344bp, 856pb, 843pb, 584pb, 556pb y 312bp). Análisis de restricción que muestra la correcta inserción de la secuencia de ADN para el shARN (2) y (3) respectivamente, en el vector plasmidial lentiviral pLU6W. Carril 1: vector pLU6W digerido con *Eco*RI y *Eco*RV (bandas esperadas: 6099pb y 372pb), carril 2: vector pLU6W/shARN digerido con *Eco*RI y *Eco*RV (bandas esperadas: 6052pb y 419pb), carril 3: mezcla de producto de digestión de carril 1 y 2 (bandas esperadas: 6099pb, 6052pb, 419pb y 312 pb).

**A**

```
shRNA (1)          1>-----* * * * *-----TCGAGAACAAGCAGAAGAAGCTTCACAGTCAAGAGCTGTGAAGCTTCTCTGCTTGTTTTTTTC----->65
pLU6W/shRNA (1) 154<TTGTGGAAGGACGCGGGATCTAGCCTCGAGAACAAGCAGAAGAAGCTTCACAGTCAAGAGCTGTGAAGCTTCTCTGCTTGTTTTTTTCCTCCGGGCTCC<55

                    * * * * *
65>-----* * * * *----->65
54<AGCATACCGGATACCTGGAATACAAAATTAAGGAATGCATGGAAAATGGCCCT<1
```

**B**

```
shRNA (2)          1>-----* * * * *-----TCGAGAATGGAACCTCACCACCAGAATCTCAAGAGGATTCCTGG>43
pLU6W/shRNA (2) 182<AAAGTATTTTCGATTCTTGGGTTTATATATCTTTGGAAAGGACGCGGGATCTAGCCTCGAGAATGGAACCTCACCACCAGAATCTCAAGAGGATTCCTGG<83

                    * * * * *
44>TGGTGAAGTCCATTTTTTTC----->65
82<TGGTGA-GTTCATTTTTTTCCTCCGCTCTCCAACATACCGGATATCGGAATGCAAAATGAAGGAATCATGGAAAATAGCTCT<1
```

**C**

```
shRNA (3)          1>-----* * * * *-----TCGAGAAGACTGGATCTGGCATGGAGAATCAAGAGTCTCCATGCCAGATC>51
pLU6W/shRNA (3) 177<TCGATTTCTTGGGTTTATATATCTTTGGAAAGGACGCGGGATCTAGCCTCGAGAAGACTGGATCTGGCATGGAGAATCAAGAGTCTCCATGCCAGATC<78

                    * * * * *
52>CAGTCTTTTTTTC----->65
77<CAGTCTTTTTTTCCTCCGGGTCAGCATATCGGATACCTGGAATACAAAATTAAGAAATGCATGAAGTCTTGTTCCT<1
```

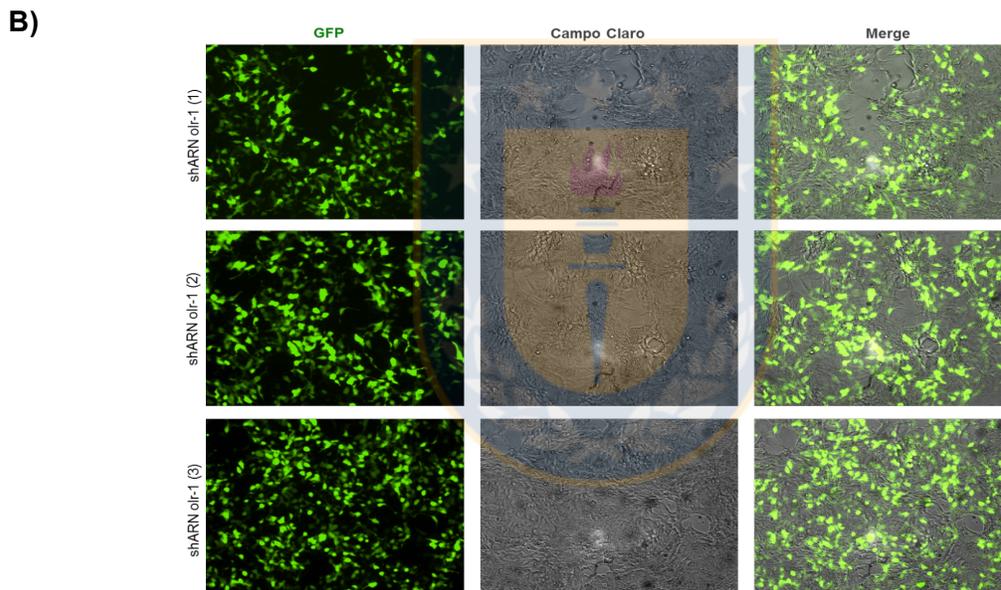
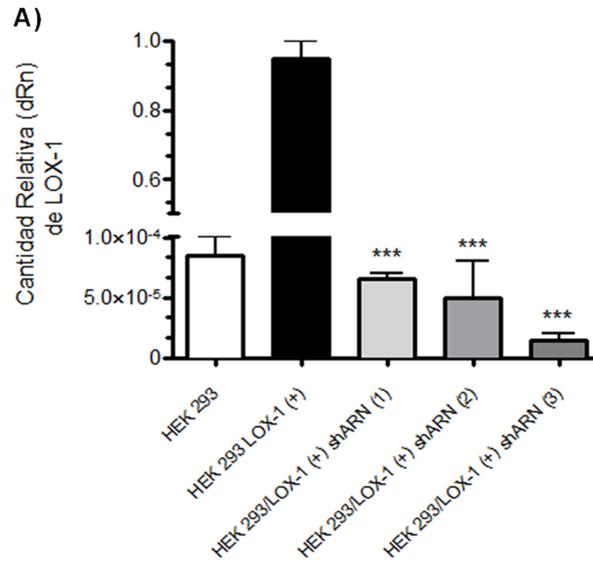
\* Matches; \_ Mismatches ; -Gaps

**Figura 14. Secuenciación y alineamiento de los vectores de transferencia lentiviral pLU6W/shRNAs.** Los vectores de transferencia lentiviral que codifican para la expresión de un shRNA contra el receptor LOX-1 fueron secuenciados utilizando el primer U6F. Para determinar el correcto subclonamiento de las secuencias codificantes para los shRNA1, shRNA2 y shRNA3 contra el receptor LOX-1 en el vector plasmidial pLU6W, las secuencias obtenidas de las secuenciaciones de los vectores pLU6W/shRNA1, pLU6W/shRNA2 y pLU6W/shRNA3 fueron alineadas con cada una de las secuencias diseñadas (Tabla nº 1) utilizando el *software* Serial Cloner 2.0. **A)** Alineamiento de la secuencia diseñada para el shRNA (1) alineada con el vector pLU6W/shRNA(1). **B)** Alineamiento de la secuencia diseñada para el shRNA (2) alineada con el vector pLU6W/shRNA (2). **C)** Alineamiento de la secuencia diseñada para el shRNA (3) alineada con el vector pLU6W/shRNA(3).

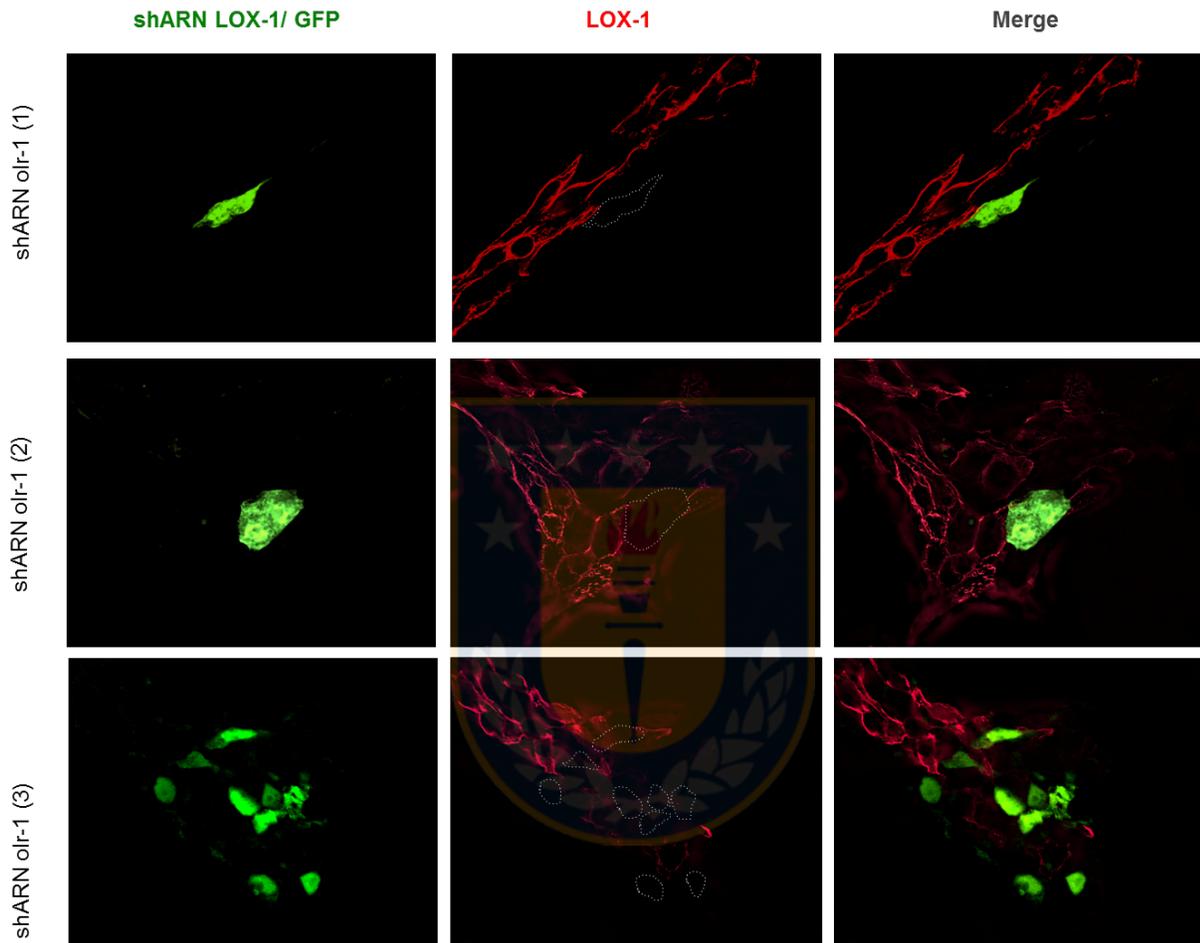
La funcionalidad de cada uno de los vectores plasmidiales generados, se evaluó mediante PCR en tiempo real e inmunocitoquímica. Se demostró que cada uno de los 3 shARN utilizados disminuyen en un 99% la expresión del ARN mensajero de LOX-1, respecto a los niveles de expresión del receptor en la línea celular HEK-293/LOX-1(+) (figura 15A). Además, este resultado fue complementado con un análisis de expresión LOX-1 mediante inmunocitoquímica en el cual se observó que las células HEK-293/LOX-1 (+) que co-expresaban GFP y el shRNA contra LOX-1, disminuyen apreciablemente la inmunoreactividad para LOX-1 en membrana (Figura 16). En conjunto, los resultados demuestran que los vectores de expresión pLU6W/shARN LOX-1 y las secuencias diseñadas para la realización de esta tesis son funcionales para disminuir de la expresión del receptor LOX-1. Para continuar los estudios de la presente tesis, se utilizaron los plásmidos de transferencia lentiviral pLU6W/shARN LOX-1 (2) y (3) (desde ahora denominados A y B respectivamente) para la generación de partículas lentivirales.

### **13.1.7. Generación de líneas celulares de cáncer de próstata que expresan establemente un shRNA contra LOX-1.**

La disminución en la expresión de LOX-1 en células C4-2 se obtuvo mediante la expresión constitutiva de un shRNA contra el mRNA de LOX-1. Para esto se transdujeron células C4-2 con los vectores lentivirales Lv-shRNA LOX-1 (A) y (B) los cuales poseen las secuencias codificantes para un shRNA contra el receptor LOX-1 controlado por el promotor U6 para Polimerasa III. Las células fueron seleccionadas por dilución limitante y la disminución en la expresión de LOX-1 se analizó por PCR en tiempo real, western blot e inmunofluorescencia (figuras 17 y 18).



**Figura 15. Expresión del receptor LOX-1 en células HEK/LOX-1(+) co-transfectadas con shARN/LOX-1 y pLGW. A)** Gráfica de los niveles de expresión relativa de LOX-1 en las líneas celulares HEK-293/LOX-1(+) transfectadas con shARN (1), (2) y (3). La gráfica representa las media  $\pm$  desviación estándar. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Análisis de varianza de un factor \*\*\*  $P \leq 0,001$ . **B)** Co-transfección de los plásmidos pLCW/U6 shARN/LOX-1 y pLGW (GFP) en células HEK-293/LOX-1(+). Microfotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 con un aumento de 20X.

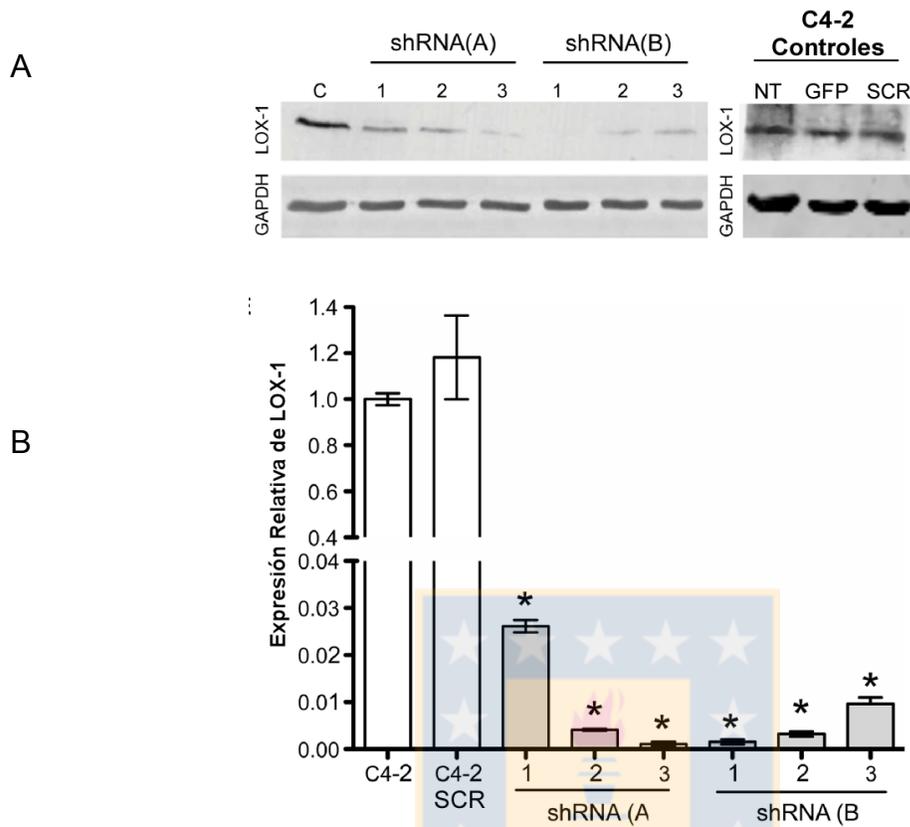


**Figura 16. Inmunodetección del receptor LOX-1 en células HEK-293/LOX-1(+)** co-transfectadas con los plásmidos pLU6W/shRNA LOX-1 y pCMV-GFP. Inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-LOX-1 humano y un anticuerpo secundario anti IgG de cabra conjugado a TEXAS-RED. Microfotografías obtenidas con microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 con un aumento de 60X.

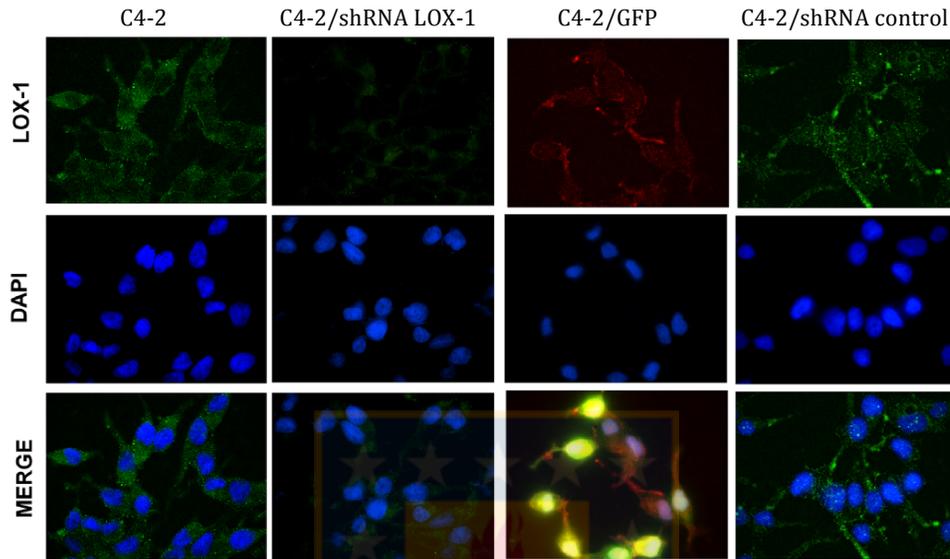
Se obtuvieron 3 clones con una disminución significativa en la expresión de LOX-1 para el shRNA (A) y tres clones para el shRNA (B). El clon seleccionado para la realización de esta tesis presentó una disminución en la expresión de LOX-1 de un 90% respecto a la expresión basal del mRNA de LOX-1 presente en células C4-2 y C4-2 shRNA control. Además, el clon seleccionado fue verificado por inmunofluorescencia y western blot, demostrando que las líneas celulares estables C4-2/shRNA-LOX-1 presentan una disminución significativa de la expresión de LOX-1 y de su localización en la membrana de células C4-2 (figura 18).



### Clones C4-2 shRNA LOX-1



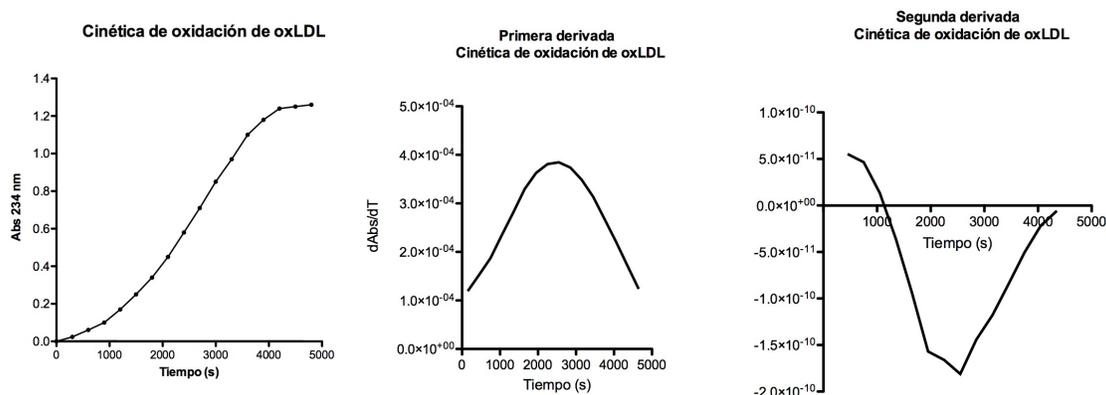
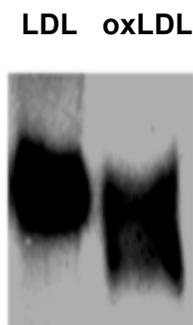
**Figura 17. Caracterización de clones de células C4-2 que expresan un shRNA contra el receptor LOX-1. A)** Western blot para clones de células de cáncer de próstata C4-2 que expresan un shRNA contra LOX-1. **B)** PCR en tiempo real para tres clones que expresan el shRNA(A), shRNA(B) y un shRNA Control (SCR), expresión relativa al control determinadas con el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como normalizador la expresión de GAPDH  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .



**Figura 18. Caracterización de clones de células C4-2 que expresan un shRNA contra el receptor LOX-1 mediante inmunocitoquímica.** El receptor LOX-1 fue inmuno detectado en las líneas celulares C4-2, C4-2/shRNA-LOX-1, C4-2/GFP y shRNA-control utilizando un anticuerpo anti-LOX-1 y un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado a FITC o anti-IgG de cabra conjugada a Texas-red en la línea celular C4-2/GFP, los núcleos fueron identificados mediante la tinción con DAPI. Microfotografías obtenidas con un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 con un aumento de 60X.

### 13.1.8. Generación de LDL oxidada mediante de la oxidación de LDL con iones $\text{Cu}^{2+}$ .

La LDL se obtuvo desde suero de pacientes normolipémicos mediante ultracentrifugación diferencial, se oxidó 1 mg/mL de LDL por 3 horas utilizando  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ . Se determinó que la LDL oxidada obtenida presentó una cinética de oxidación normal para LDL. De esta manera, a partir de la primera y segunda derivada de la cinética de oxidación de la LDL se obtuvo un tiempo de fase de retardo (fase lag) de 1178 segundos, un tiempo máximo de producción de dienos conjugados de 4373 segundos y una velocidad de propagación de  $3,5 \times 10^{-4}$  unidades de absorbancia a 234 nm por segundo (figura 19A). Uno de los cambios fisicoquímicos más importantes desencadenados por la lipoperoxidación de la LDL es el aumento en las cargas negativas expuestas en su superficie aumentando su movilidad electroforética respecto a LDL en geles de agarosa al 1% en tampón barbital. Se demostró que la oxLDL generada para el desarrollo de este trabajo de tesis posee una movilidad electroforética mayor comparada con la LDL, con un Rf de 0,6 para LDL vs un Rf de 0.8 para oxLDL (figura 19B). Además, los procesos de lipoperoxidación lipídica generan aldehídos reactivos (ej: malondialdehído, MDA), como productos finales de oxidación. Analizamos su concentración en la oxLDL generada a través de una reacción colorimétrica con ácido tiobarbitúrico y se determinó que la oxLDL posee una mayor concentración de MDA que la LDL (134 nmoles MDA/mg de proteína *versus* 4 nmoles MDA/mg de proteína). Por lo tanto, confirmamos que la oxLDL presenta las características necesarias que confirman su correcta oxidación (figura 19C).

**A****B****C**

Muestra	Abs 532 nm	Concentración MDA [nmoles/mg proteína]
LDL	0.024	4
oxLDL	0.82	134

**Figura 19. Generación de LDL oxidada mediante la oxidación de LDL con iones  $\text{Cu}^{2+}$ .** La LDL fue obtenida por ultracentrifugación diferencial desde una mezcla de sueros de donantes normolipémicos. Se oxidó 1 mg/mL de LDL utilizando  $\text{CuSO}_4$  (10  $\mu\text{M}$ ) durante 3 horas. **A)** Monitoreo de la cinética de oxidación de LDL utilizando detección espectrofotométrica de dienos conjugados a  $\lambda$  234nm, análisis de primera y segunda derivada para determinar los parámetros cinéticos de la oxidación de LDL. **B)** Análisis de migración electroforética de oxLDL y LDL en gel de agarosa al 1%. **C)** Cuantificación de malondialdehído en la oxLDL generada utilizando el método del ácido tiobarbitúrico.

## **13.2. Resultados objetivo 2. Determinar la función de la oxLDL y del receptor LOX-1 en la angiogénesis de células humanas de cáncer próstata.**

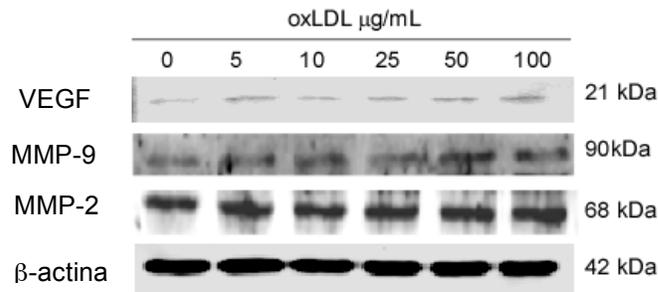
### **13.2.1. La oxLDL induce la expresión de marcadores pro-angiogénicos en células humanas de cáncer de próstata.**

Para determinar el efecto de oxLDL en la angiogénesis tumoral de cáncer de próstata analizamos, mediante western blot, la expresión de VEGF, MMP-2 y MMP-9 en células de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y DU145 tratadas con concentraciones crecientes oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 48 horas.

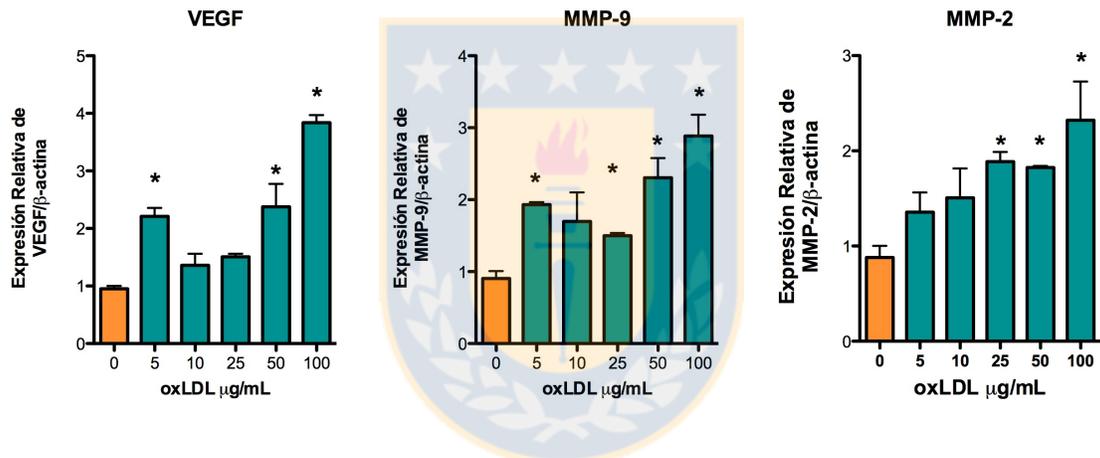
Se determinó que las 3 líneas celulares utilizadas incrementan significativamente la expresión de los tres marcadores pro-angiogénicos analizados en una forma dependiente de las concentraciones de oxLDL utilizadas (figuras 20, 21 y 22). Así, observamos que la concentración mas alta de oxLDL 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  indujo un aumento significativo en la expresión del marcador VEGF de 3.7, 2.0 y 2.7 veces para las líneas celulares LNCaP, C4-2 y DU-145 respectivamente, en comparación con las líneas celulares no tratadas con oxLDL. De igual manera, para el marcador MMP-9 el tratamiento con oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) indujo un aumento significativo en su expresión de 2.7, 2.1 y 1.8 veces para las líneas celulares LNCaP, C4-2 y DU-145 respectivamente, en comparación con las líneas celulares no tratadas. Además, para el marcador MMP-2 se observó que el tratamiento con oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) indujo un aumento significativo en la expresión de este marcador en 2.3, 1.6 y 1.8 veces para las líneas celulares LNCaP, C4-2 y DU145 respectivamente, en comparación con las líneas celulares no tratadas con oxLDL.

## Marcadores de angiogenesis en la línea celular LNCaP

A



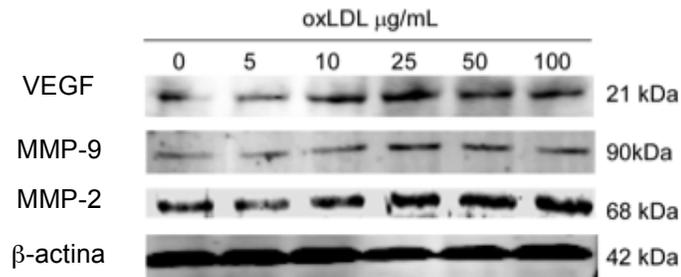
B



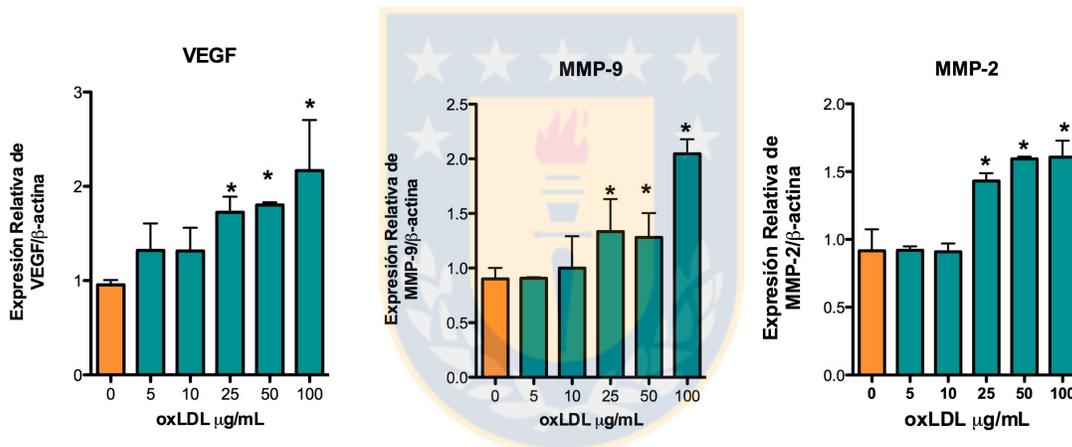
**Figura 20. Expresión de marcadores pro-angiogénicos en células de cáncer de próstata LNCaP tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.** **A)** Las células LNCaP fueron incubadas con oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL) por 48 horas. Posteriormente, se analizó la expresión de 3 marcadores pro-angiogénicos mediante western blot utilizando los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano, anticuerpo policlonal anti-MMP-9 humana, policlonal anti-MMP-2 humana, y el anticuerpo monoclonal anti-β-actina humana. Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anti IgG de ratón y conejo conjugados a Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR. **B)** La gráfica representa las medias de las densidades de banda normalizada por β-actina ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

## Marcadores de angiogenesis en la línea celular C4-2

A



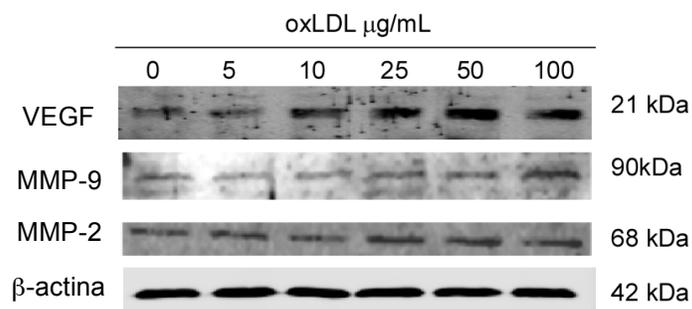
B



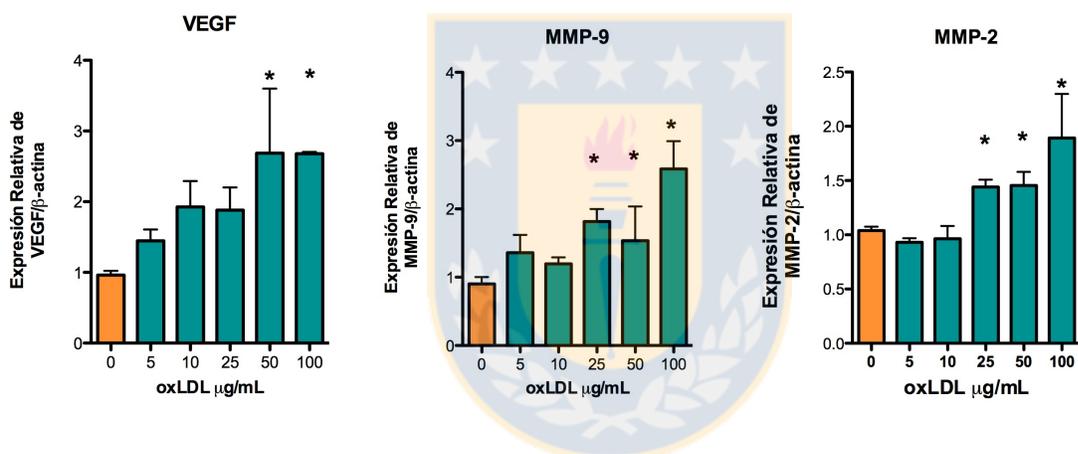
**Figura 21. Expresión de marcadores pro-angiogénicos en células de cáncer de próstata C4-2 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.** A) Las células C4-2 fueron incubadas con oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL) por 48 horas. Posteriormente, se analizó la expresión de 3 marcadores pro-angiogénicos mediante western blot utilizando los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano, anticuerpo policlonal anti-MMP-9 humana, policlonal anti-MMP-2 humana, y el anticuerpo monoclonal anti-β-actina humana. Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anti-IgG de ratón y conejo conjugados a Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR. B) La gráfica representa las medias de las densidades de banda de LOX-1 normalizada por β-actina ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

A

### Marcadores de angiogenesis en la línea celular DU145



B



**Figura 22. Expresión de marcadores pro-angiogénicos en células de cáncer de próstata DU-145 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.** A) Las células DU-145 fueron incubadas con oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL) por 48 horas. Posteriormente, se analizó la expresión de 3 marcadores pro-angiogénicos mediante western blot utilizando los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano, anticuerpo policlonal anti-MMP-9 humana, policlonal anti-MMP-2 humana, y el anticuerpo monoclonal anti-β-actina humana. Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anti-IgG de ratón y conejo conjugados a Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR. B) La gráfica representa las medias de las densidades de banda de normalizada por β-actina ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

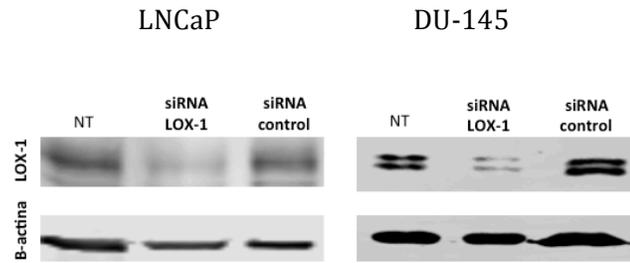
### **13.2.2. La expresión de marcadores pro-angiogénicos inducida por la oxLDL depende del receptor LOX-1.**

Para determinar si los efectos observados en la expresión de los marcadores pro-angiogénicos inducidos por oxLDL son dependientes del receptor LOX-1, analizamos el efecto de oxLDL sobre la expresión de marcadores pro-angiogénicos en células de cáncer de próstata LNCaP y DU-145 transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y en la línea celular estable C4-2/shRNA-LOX-1. Primero, determinamos que los tratamientos con un siRNA contra LOX-1 generaran una disminución en la expresión del receptor en células LNCaP y DU-145 transfectadas por 48 horas. Determinamos mediante western blot que el siRNA utilizado contra LOX-1 disminuye significativamente la expresión de LOX-1 en un 52% y en un 70% en células LNCaP y DU-145 respecto a los controles transfectados con un siRNA control (figura 23). Posteriormente las células se trataron con oxLDL (100 µg/mL) durante 24 horas y la expresión de marcadores pro-angiogénicos se analizó por PCR en tiempo real.

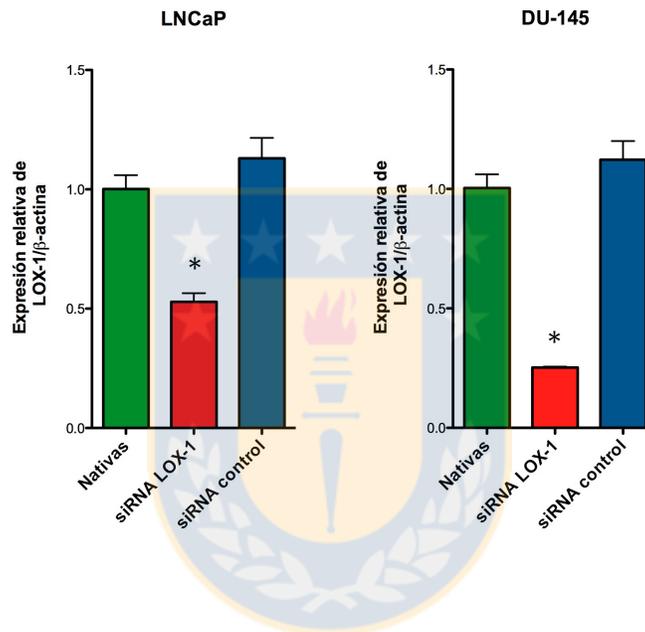
Se determinó, mediante PCR en tiempo real, que el tratamiento con oxLDL (100 µg/mL) en las líneas LNCaP y DU-145 transfectadas con un siRNA-control, incrementa significativamente la expresión de los marcadores pro-angiogénicos VEGF en 2.3 y 5.7 veces, MMP-9 en 1.7 y 5.6 veces, MMP-2 en 1.6 y 6.1 veces y, respectivamente, en comparación con las células sin tratamiento con oxLDL. Sin embargo, los efectos de oxLDL sobre la inducción de la expresión de los marcadores pro-angiogénicos VEGF, MMP-9 y MMP-2 en células de cáncer de próstata LNCaP y DU-145 son prevenidos al utilizar un siRNA contra este receptor

48 horas previo a los tratamientos con oxLDL (figuras 24 y 25). De igual manera, determinamos que el tratamiento con oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la línea celular C4-2/shRNA-control induce un aumento significativo de la expresión a nivel de mRNA de VEGF en 2,1 veces, MMP-2 en 1,8 veces y MMP-9 en 2,5 veces, respectivamente, en comparación con la línea celular sin tratamiento (figura 26). Además, determinamos mediante western blot que el tratamiento con oxLDL induce un aumento en la expresión de VEGF en 1.8 veces, MMP-2 2.1 veces y MMP-9 en 1.9 veces, respecto a los controles sin tratamiento con oxLDL (figura 27). Sin embargo, los tratamientos con oxLDL no indujeron cambios significativos en la expresión de VEGF, MMP-2 y MMP-9 en la línea que expresan constitutivamente un shRNA contra LOX-1 (C4-2/shRNA-LOX-1), sugiriendo que la activación de LOX-1 por oxLDL modula positivamente la expresión de proteínas pro-angiogénicas en los modelos celulares de cáncer de próstata estudiados (figuras 24, 25, 26 y 27)

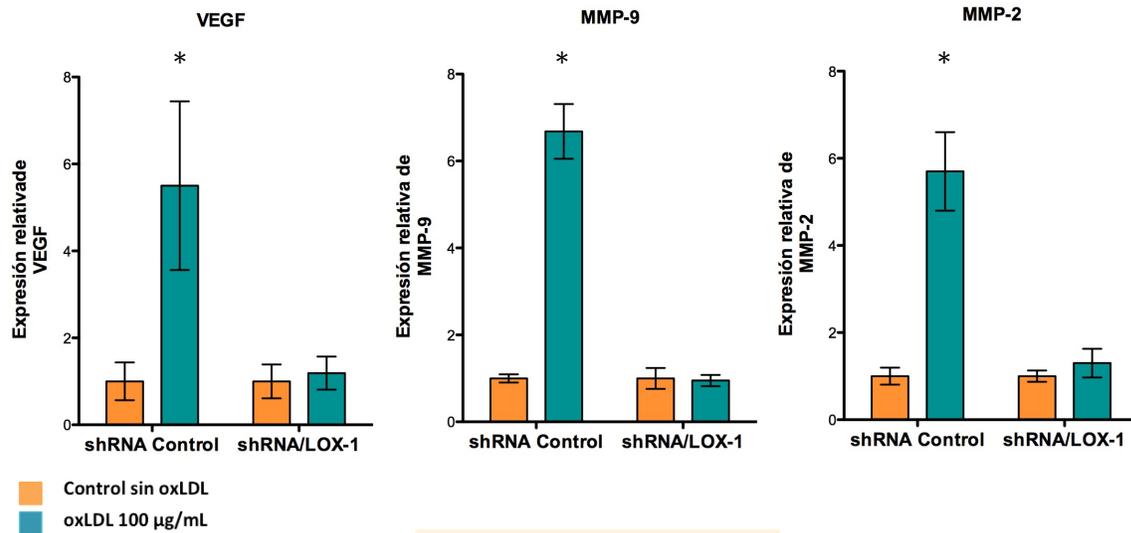
A



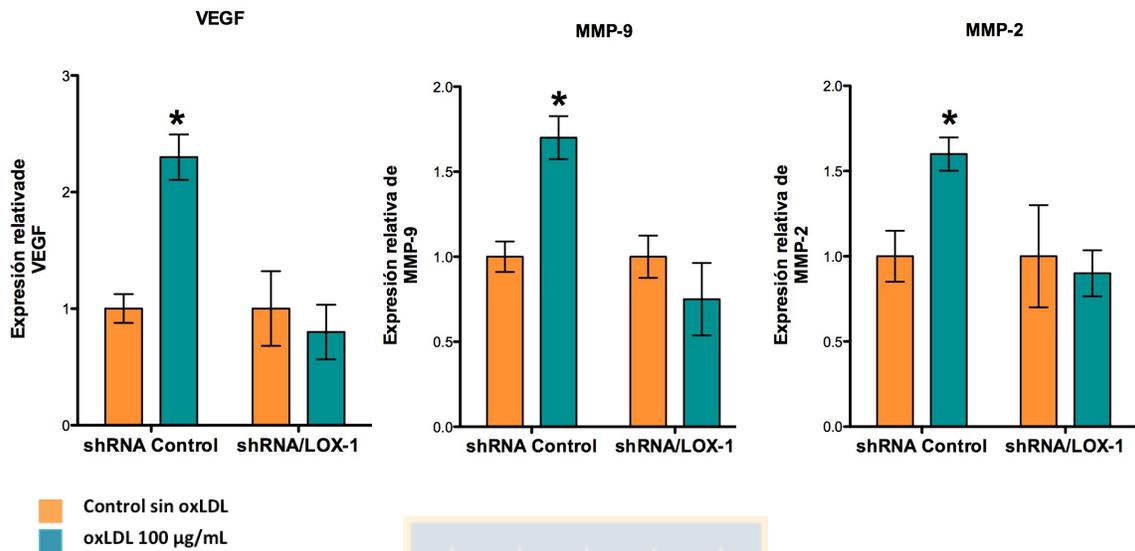
B



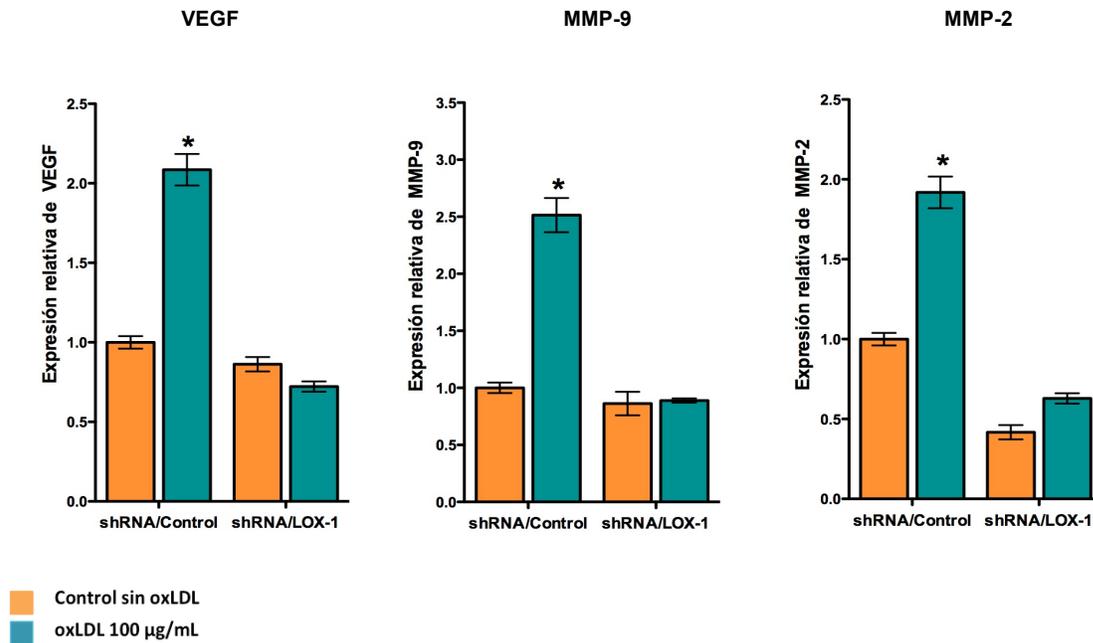
**Figura 23. Expresión relativa de LOX-1 en células LNCaP y DU-145 transfectadas con un siRNA contra LOX-1.** A) Western blot para la detección de LOX-1 en células de cáncer de próstata LNCaP y DU-145, transfectadas con 50 picomoles de un siRNA contra el receptor LOX-1 o un siRNA control, por 48 horas. La detección de LOX-1 se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal ox-LDLR-1/LOX19-22 y el anticuerpo monoclonal anti β-actina B) La gráfica representa las medias de las densidades de banda de LOX-1 normalizada por β-actina ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .



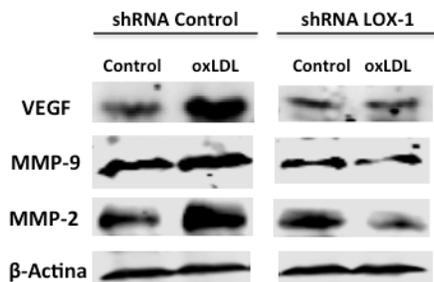
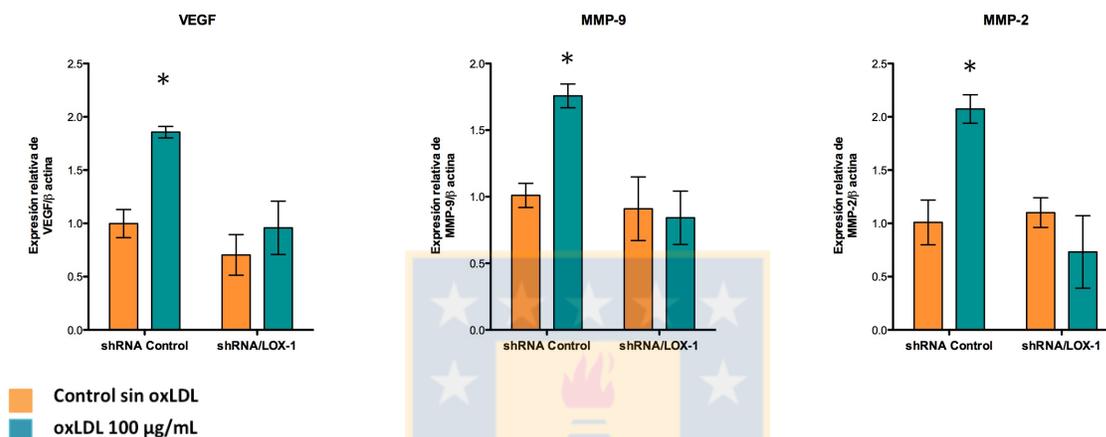
**Figura 24. Expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos de células DU-145 transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y tratadas con oxLDL.** Análisis de expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos mediante PCR en tiempo real desde mRNA total de células de cáncer de próstata DU-145 transfectadas con 50 picomoles de siRNA contra el receptor LOX-1 o siRNA control y tratadas 100 µg/mL de oxLDL por 24 horas **B)** La gráfica representa las medias de expresión relativa de VEGF, MMP-9 y MMP-2 determinadas con el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como normalizador la expresión de  $\beta$ -actina  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .



**Figura 25. Expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos de células LNCaP transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y tratadas con oxLDL.** Análisis de expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos mediante PCR en tiempo real desde mRNA total de células de cáncer de próstata LNCaP transfectadas con 50 picomoles de siRNA contra el receptor LOX-1 o siRNA control y tratadas 100 µg/mL de oxLDL por 24 horas . **B)** La gráfica representa las medias de expresión relativa de VEGF, MMP-9 y MMP-2 determinadas con el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como normalizador la expresión de  $\beta$ -actina  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .



**Figura 26. Expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos de células C4-2 shRNA/LOX-1 y shRNA control tratadas oxLDL.** A) Análisis de expresión relativa de VEGF, MMP-2 y MMP-9 mediante PCR en tiempo real de muestras de mRNA total de células de cáncer de próstata C4-2 shRNA/LOX-1 y shRNA/control tratadas con oxLDL (100 µg/mL) durante 24 horas. B) La gráfica representa las medias de expresión relativa de VEGF, MMP-9 y MMP-2 analizadas con el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como normalizador la expresión de  $\beta$ -actina  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

**A****B**

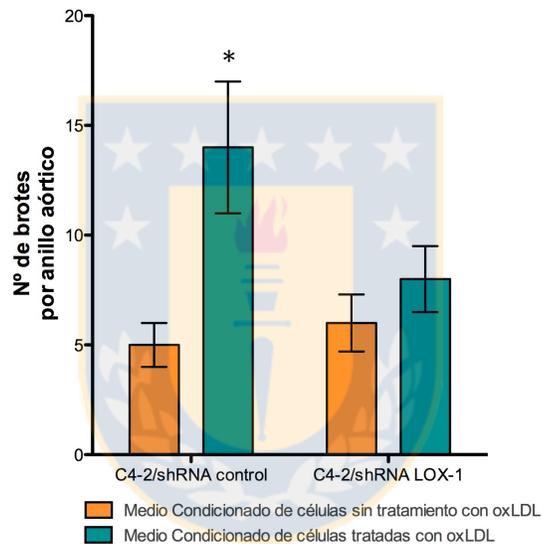
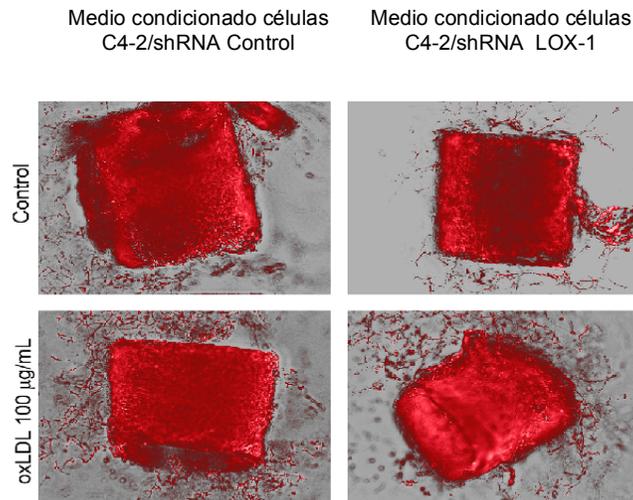
**Figura 27. Expresión relativa de marcadores pro-angiogénicos en las líneas celulares estables cáncer de próstata C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con oxLDL.** **A)** Se analizaron por western blot la expresión relativa de los marcadores pro-angiogénicos VEGF, MMP-2, y MMP-9 en muestras de proteínas totales de las líneas celulares estables C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA-control tratadas con oxLDL (100 µg/mL) durante 48 horas. **B)** Las gráficas representan las medias de las densidades de banda de VEGF, MMP-2, y MMP-9 de normalizada por β-actina ± s.d. de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

### **13.2.3. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve la generación de brotes vasculares en anillos aórticos de ratón.**

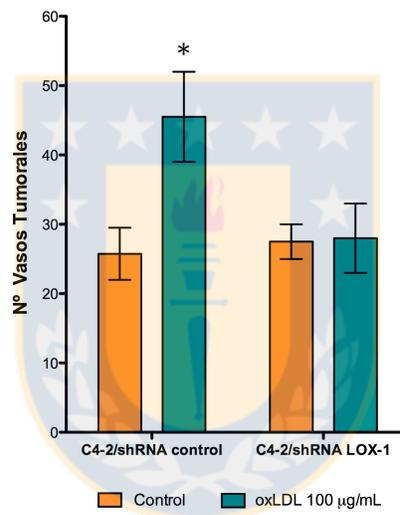
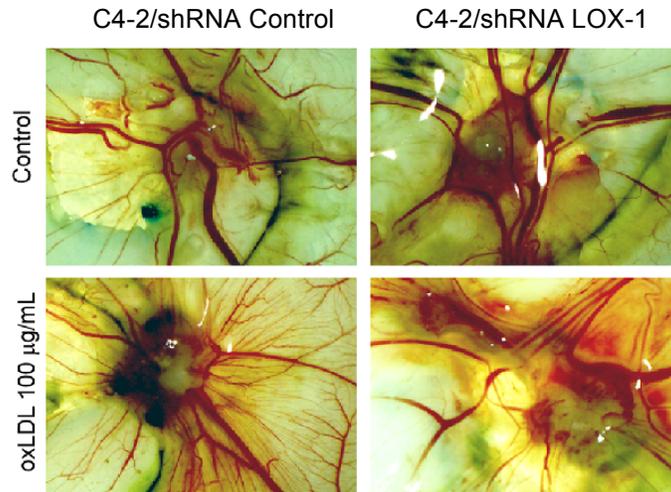
Con la finalidad de determinar si el aumento en la expresión de marcadores pro-angiogénicos mediada por oxLDL y LOX-1 tiene alguna consecuencia biológica en la inducción de la angiogénesis, analizamos el efecto de medios condicionados obtenidos desde células de cáncer de próstata tratadas con oxLDL, en la generación de brotes vasculares en anillos aórticos de ratón. Se tomaron medios condicionados de células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA-control tratadas con oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 48 horas, se concentraron y cuantificaron. Posteriormente, se extrajeron anillos aórticos de ratón mantenidos en un soporte de colágeno en medio Opti-MEM, y se incubaron con 10  $\mu\text{g}$  de proteínas de cada uno de los medios condicionados durante 5 días. Mediante los análisis de microscopia confocal se observó que los tratamientos con medios condicionados obtenidos desde células C4-2/shRNA-control tratadas con oxLDL por 48 horas promueven un incremento significativo en el número de brotes de anillos aórticos con respecto a células C4-2/shRNA-control no tratadas con oxLDL. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en los tratamientos con medios condicionados obtenidos desde células C4-2/shRNA-LOX-1 estimuladas con oxLDL. Estos resultados sugieren que la expresión de moléculas pro-angiogénicas inducidas por la activación de LOX-1 por oxLDL en células de cáncer de próstata, estimulan la generación de brotes de anillos aórticos en este modelo *ex vivo* (figura 28).

#### **13.2.4. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve la angiogénesis de *xenografts* de células de cáncer de próstata en membranas corioalantoideas de embriones de pollo.**

Para los estudios de angiogénesis en membranas corioalantoideas de embriones de pollo (CAM), se pre-incubaron células de cáncer de próstata C4-2/shRNA control y C4-2/shRNA-LOX-1 con oxLDL 100 µg/mL por 2 horas. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células fueron inoculadas sobre la CAM de embriones de 10 días de desarrollo. Cinco días posteriores a la inoculación, los tumores fueron extraídos y se cuantificó el número de vasos sanguíneos asociados al tumor para cada uno de los casos. Se determinó que los tumores de células C4-2/shRNA-control pre-incubadas con oxLDL presentan un número significativamente mayor de vasos sanguíneos asociados al tumor en comparación con la línea celular sin pre-tratamiento con oxLDL. Interesantemente, no observamos cambios significativos en el número de vasos sanguíneos asociados a tumores de células C4-2/shRNA-LOX-1 pre-tratadas con oxLDL, en comparación con la línea celular sin pre-estímulo, sugiriendo que la activación de LOX-1 por oxLDL induce la angiogénesis tumoral *in vivo* de células humanas de cáncer de próstata (figura 29).



**Figura 28. Análisis de la capacidad angiogénica de medios condicionados de células de cáncer de próstata tratadas con oxLDL, mediante el ensayo de generación de brotes de anillos aórticos de ratón.** Análisis mediante microscopía de fluorescencia de brotes de anillos aórticos incubados con medios condicionados de células C4-2/shRNA-control C4-2/shRNA-LOX-1 incubadas con oxLDL (100 µg/mL). Las gráficas representan las medias del número de brotes generados en anillos aórticos de ratón ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .



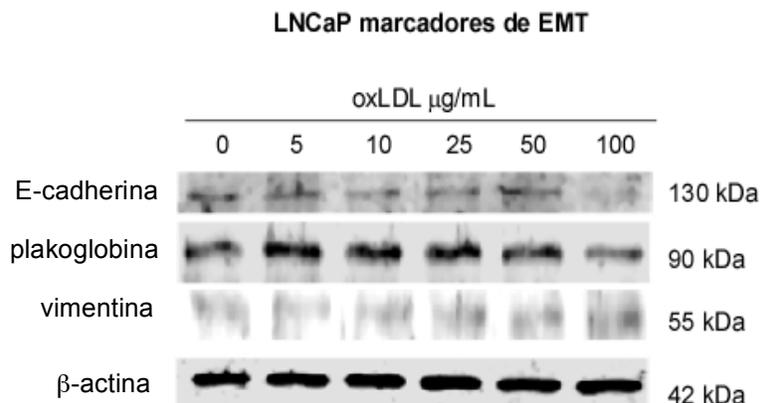
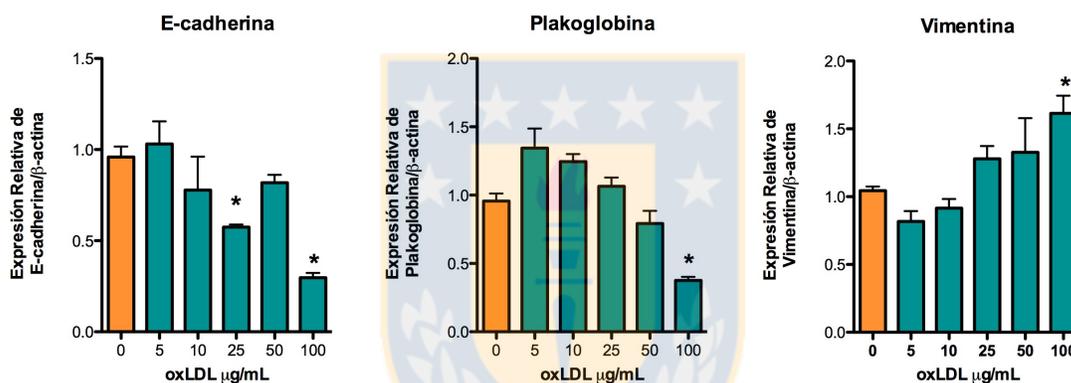
**Figura 29. Análisis de la función de LOX-1 y oxLDL en la angiogénesis tumoral de xenografts de células de cáncer de próstata en membranas corioalantoideas de embriones de pollo. A) Microfotografía de xenografts de células C4-2/shRNA control C4-2/shRNA-LOX-1 pre-incubadas con o sin oxLDL (100 µg/mL) e inoculadas en CAM por 5 días. La gráfica representa las medias del número de vasos sanguíneos generados en xenografts de células de cáncer de próstata ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .**

### **13.3. Resultados objetivo 3. Determinar la función del receptor LOX-1 en la transición epitelio mesenquimal, la invasión y el crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata humanas.**

#### **13.3.1. La oxLDL induce la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata.**

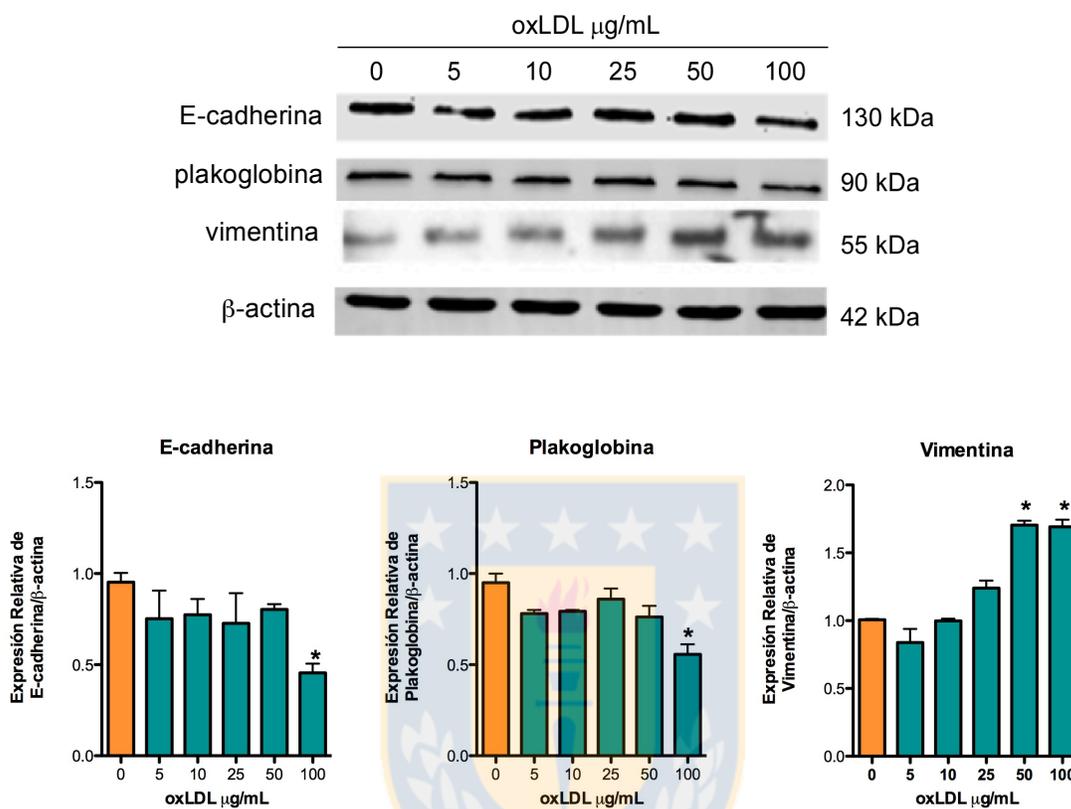
La transición epitelio mesenquimal en cáncer es un proceso en el cual células epiteliales pierden muchas de sus características y adquieren características propias de células mesenquimales, aumentando la secreción de proteasas de matriz y reorganizando el citoesqueleto para generar morfotipos celulares con capacidad migratoria e invasiva.

Para determinar el efecto de oxLDL en la EMT de células de cáncer de próstata, se incubaron células LNCaP, C4-2 y DU-145 con concentraciones crecientes de oxLDL durante 48 horas. Posteriormente, se determinó la expresión de los marcadores de EMT: E-cadherina, plakoglobina (epiteliales) y vimentina (mesenquimal) mediante western blot. Se observó una disminución significativa en la expresión de los marcadores epiteliales, E-cadherina y plakoglobina dependiente de las concentraciones de oxLDL utilizadas y con un mínimo de expresión para los tratamientos con oxLDL (100 µg/mL), para las tres líneas de cáncer de próstata estudiadas. Determinamos que los tratamientos con oxLDL (100 µg/mL) disminuyen significativamente la expresión de E-cadherina en un 70 %, 50% y 70% y plakoglobina en un 75%, 50% y 75% para las líneas celulares LNCaP, C4-2 y DU-145 respectivamente, en comparación con las líneas celulares sin tratamiento con oxLDL. De igual manera determinamos que los tratamientos con oxLDL (100 µg/mL) aumentan significativamente la expresión de vimentina en 1.6, 1.6 y 1,8 veces para las líneas celulares LNCaP, C4-2 y DU-145 respectivamente, en comparación con las líneas celulares sin tratamiento con oxLDL (figuras 30, 31 y 32).

**A****B**

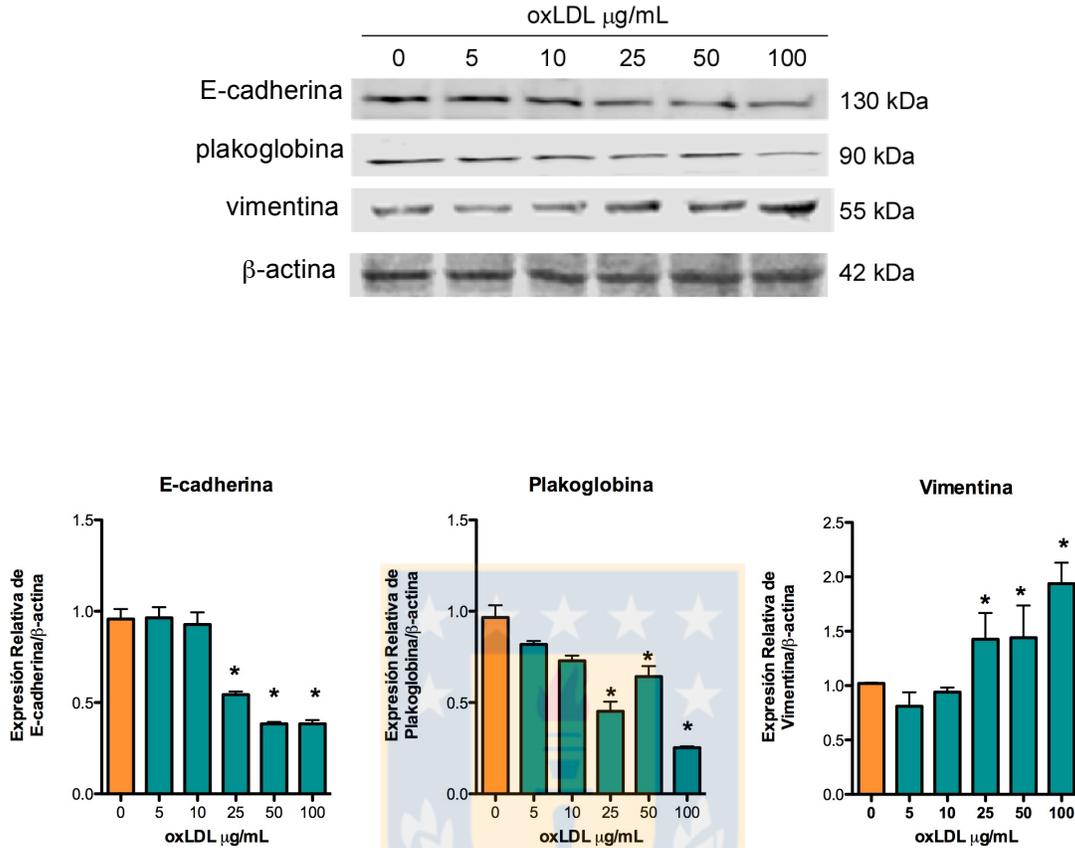
**Figura 30. Expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata LNCaP tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.** Análisis de expresión mediante western blot de E-Cadherina, plakoglobina y vimentina en extractos de proteínas totales de células LNCaP tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 48 horas. Para la detección de cada uno de los marcadores de EMT analizados se utilizaron los anticuerpos primarios monoclonal anti E-cadherina, policlonal anti plakoglobina, anticuerpo policlonal anti-vimentina y como control de carga se utilizó la detección de  $\beta$ -actina con el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina. Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos anti IgG de ratón, anti-IgG de conejo y anti-IgG de cabra conjugados a Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR. Las gráficas representa las medias de las densidades de banda de los marcadores de EMT normalizado por  $\beta$ -actina  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

### C4-2 marcadores de EMT



**Figura 31. Expresión de marcadores de Transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata C4-2 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.** Análisis de expresión mediante western blot de E-cadherina, plakoglobina y vimentina en extractos de proteínas totales de células C4-2 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL) durante 48 horas. Para la detección de cada uno de los marcadores de EMT analizados se utilizaron los anticuerpos primarios monoclonal anti E-cadherina, policlonal anti plakoglobina, anticuerpo policlonal anti-vimentina y como control de carga se utilizó la detección de β-actina con el anticuerpo monoclonal anti-β-actina. Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos anti IgG de ratón, anti-IgG de conejo y anti-IgG de cabra conjugados a Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR. Las gráficas representa las medias de las densidades de banda de los marcadores de EMT normalizado por β-actina ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

### DU-145 marcadores de EMT



**Figura 32. Expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata DU-145 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.**

Análisis de expresión mediante western blot de E-cadherina, plakoglobina y vimentina en extractos de proteínas totales de células DU-145 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL) durante 48 horas. Para la detección de cada uno de los marcadores de EMT analizados se utilizaron los anticuerpos primarios monoclonal anti E-cadherina, policlonal anti plakoglobina, anticuerpo policlonal anti-vimentina y como control de carga se utilizó la detección de β-actina con el anticuerpo monoclonal anti-β-actina. Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos anti IgG de ratón, anti-IgG de conejo y anti-IgG de cabra conjugados a Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR. Las gráficas representa las medias de las densidades de banda de los marcadores de EMT normalizado por β-actina ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

### 13.3.2. La expresión de marcadores de EMT inducida por oxLDL depende del receptor LOX-1.

Para determinar si los efectos en la expresión de los marcadores de EMT inducida por oxLDL dependen de LOX-1 analizamos el efecto de esta lipoproteína modificada en la expresión de marcadores de EMT en células de cáncer de próstata LNCaP y DU-145 transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1. De igual manera, analizamos el efecto de oxLDL en la expresión de marcadores EMT en las líneas celulares estables C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA-control. Las líneas celulares transfectadas con siRNA control, siRNA contra LOX-1 o las líneas estables C4-2/shRNA control o C4-2/shRNA-LOX-1 fueron tratadas con oxLDL (100 µg/mL) durante 24 horas. Se analizó mediante PCR en tiempo real la expresión relativa de dos marcadores epiteliales: E-cadherina y plakoglobina, dos marcadores mesenquimales: vimentina y N-cadherina, y cuatro factores de transcripción asociados a EMT: *snail*, *slug*, *twist* y *zeb-1*; estos últimos modulan la represión transcripcional de marcadores epiteliales y la activación transcripcional de marcadores mesenquimales.

Se determinó que los tratamientos con oxLDL (100 µg/mL) disminuyeron significativamente la expresión relativa de E-cadherina en un 30%, 35% y 20% y plakoglobina 35%, 37% y 24% para las líneas LNCaP/siRNA control, C4-2/shRNA-control y DU-145/siRNA control respectivamente, en comparación con las líneas celulares sin tratamiento con oxLDL (figuras 33, 34 y 35). Además, observamos que los tratamientos con oxLDL (100 µg/mL) aumentan significativamente la expresión de vimentina en 1.5, 1.9 y 1.6 veces y la expresión de N-cadherina en 1.3, 1.6 y 1.3 veces en las líneas LNCaP/siRNA control, C4-2/shRNA-control y DU-145/siRNA control, respectivamente, en comparación con las líneas celulares sin tratamiento con oxLDL.

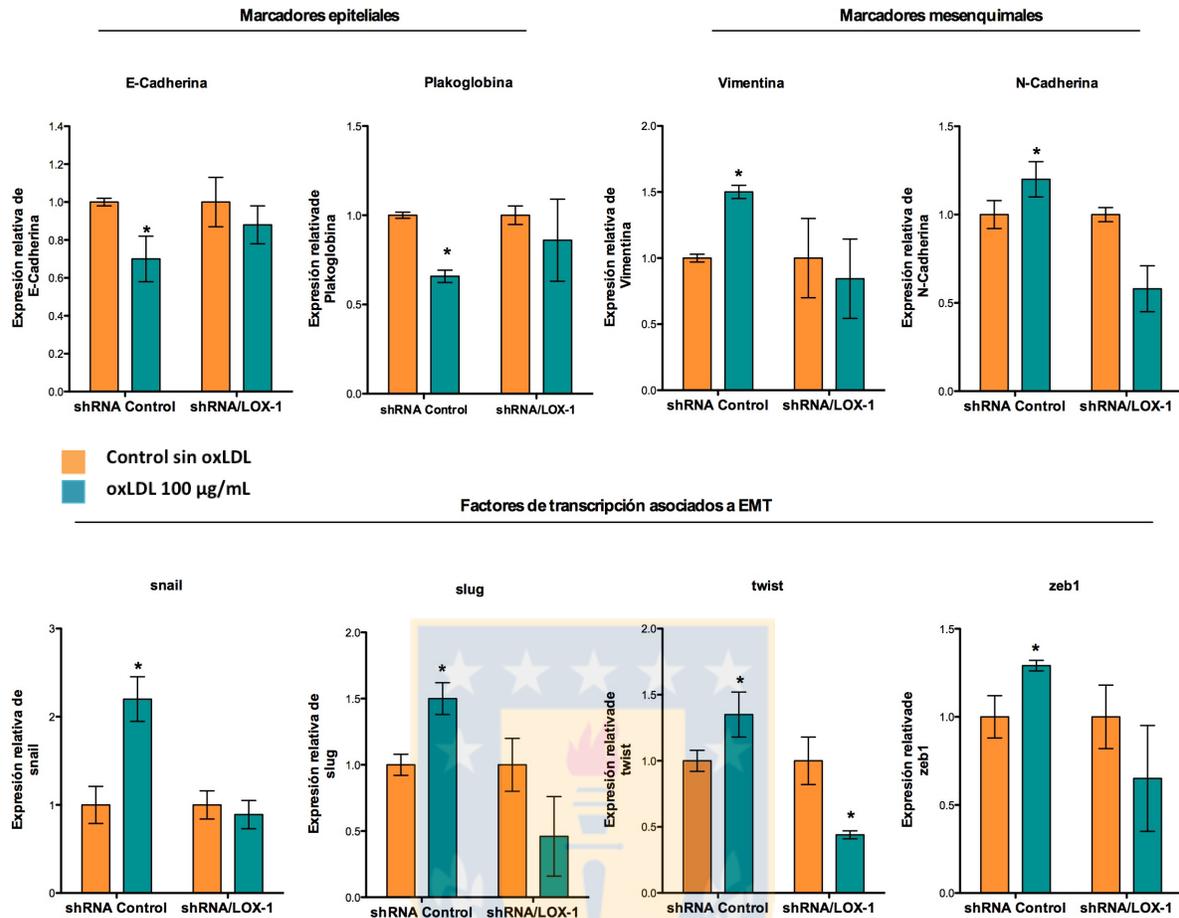
De igual manera, los tratamientos con oxLDL inducen cambios significativos en la expresión de los factores de transcripción asociados a EMT, observamos que el tratamiento con oxLDL induce un aumento significativo en la expresión de *snail* en 2.2, 1.2 y 1.8 veces, y *slug* en 1.5, 1.8 y 1.7 veces en las líneas LNCaP/siRNA-control, C4-2/shRNA-control y DU-145/siRNA-control, respectivamente, en comparación con las líneas celulares sin tratamiento con oxLDL. Además, determinamos que los tratamientos con oxLDL aumenta significativamente la expresión de *twist* en 1.4 veces sólo en la línea LNCaP/siRNA-control, sin observar cambios significativos en las líneas celulares C4-2/shRNA-control y DU-145/siRNA en comparación con las líneas celulares sin tratamiento con oxLDL. Por último, para el marcador *zeb1* determinamos que los tratamientos con oxLDL indujeron un aumento significativo en su expresión en 1.3 y 1.4 veces para las líneas celulares LNCaP/siRNA-control y C4-2/shRNA-control, respectivamente, sin observar cambios significativos para la línea DU-145/siRNA-control (figuras 33, 34 y 35).

Los tratamientos con oxLDL en las líneas celulares que presentan una disminución en la expresión de LOX-1 mediante la utilización de un siRNA o un shRNA contra este receptor, no presentaron cambios significativos en la expresión de los dos marcadores epiteliales (E-cadherina, plakoglobina) y los marcadores mesenquimales (vimentina y N-cadherina). De forma similar no se observaron cambios significativos en la expresión de *snail*, *slug*, *twist* y *zeb1* para las tres líneas celulares (LNCaP/siRNA-LOX-1, C4-2/shRNA-LOX-1 y Du-145/siRNA-LOX-1) respectivamente, en comparación con mismas líneas sin tratamiento con oxLDL (figuras 33, 34 y 35).

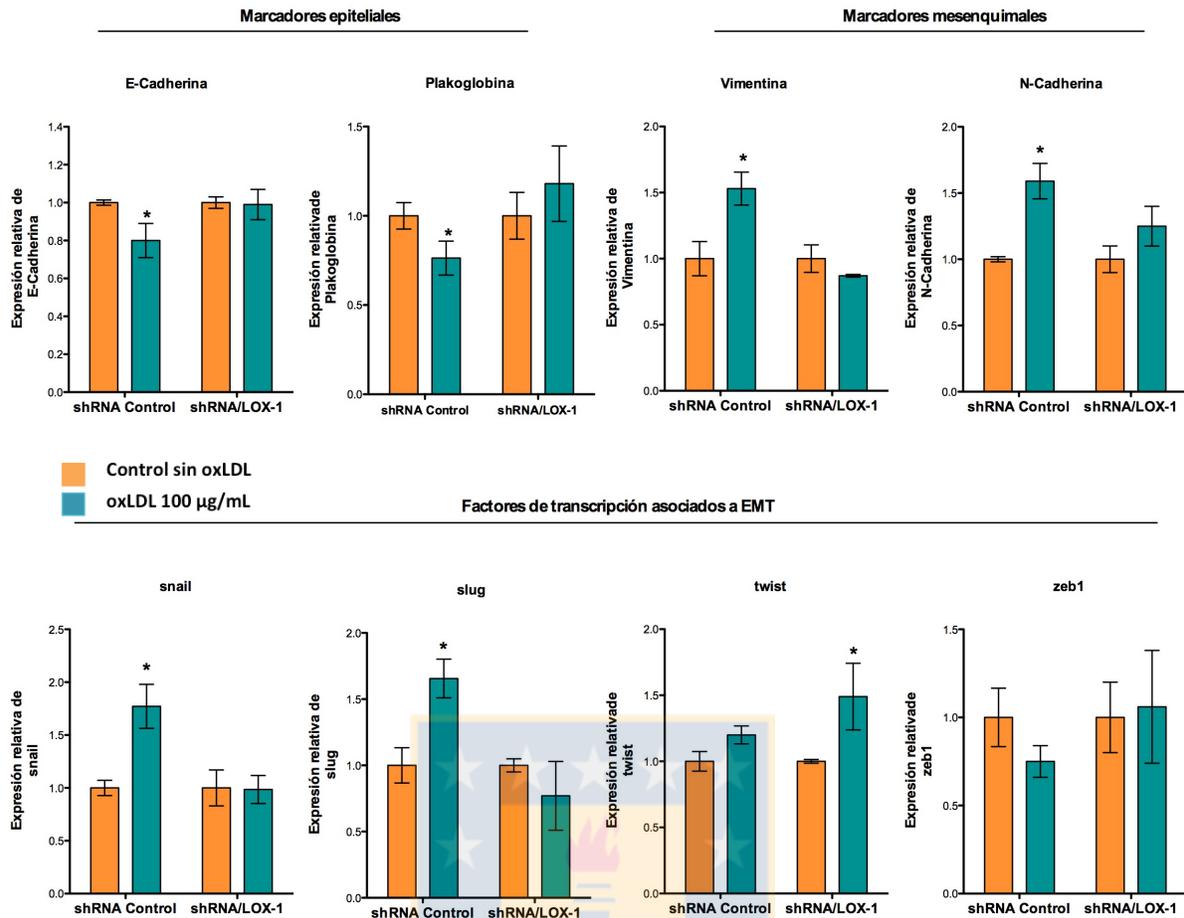
Además, determinamos mediante western blot que el tratamiento con oxLDL en células C4-2/shRNA-control disminuye significativamente la expresión de E-

cadherina en un 75% y plakoglobina 40% respecto a los controles sin tratamiento con oxLDL. De igual manera, observamos que los tratamientos con oxLDL inducen un aumento significativo en la expresión de vimentina de 1.6 veces respecto al control sin tratamiento con oxLDL. Sin embargo, los tratamientos con oxLDL no indujeron cambios significativos en la expresión de E-cadherina, plakoglobina y vimentina en la línea que expresan constitutivamente un shRNA contra LOX-1 (C4-2/shRNA-LOX-1), sugiriendo que la activación de LOX-1 por oxLDL induce una EMT (figura 36).

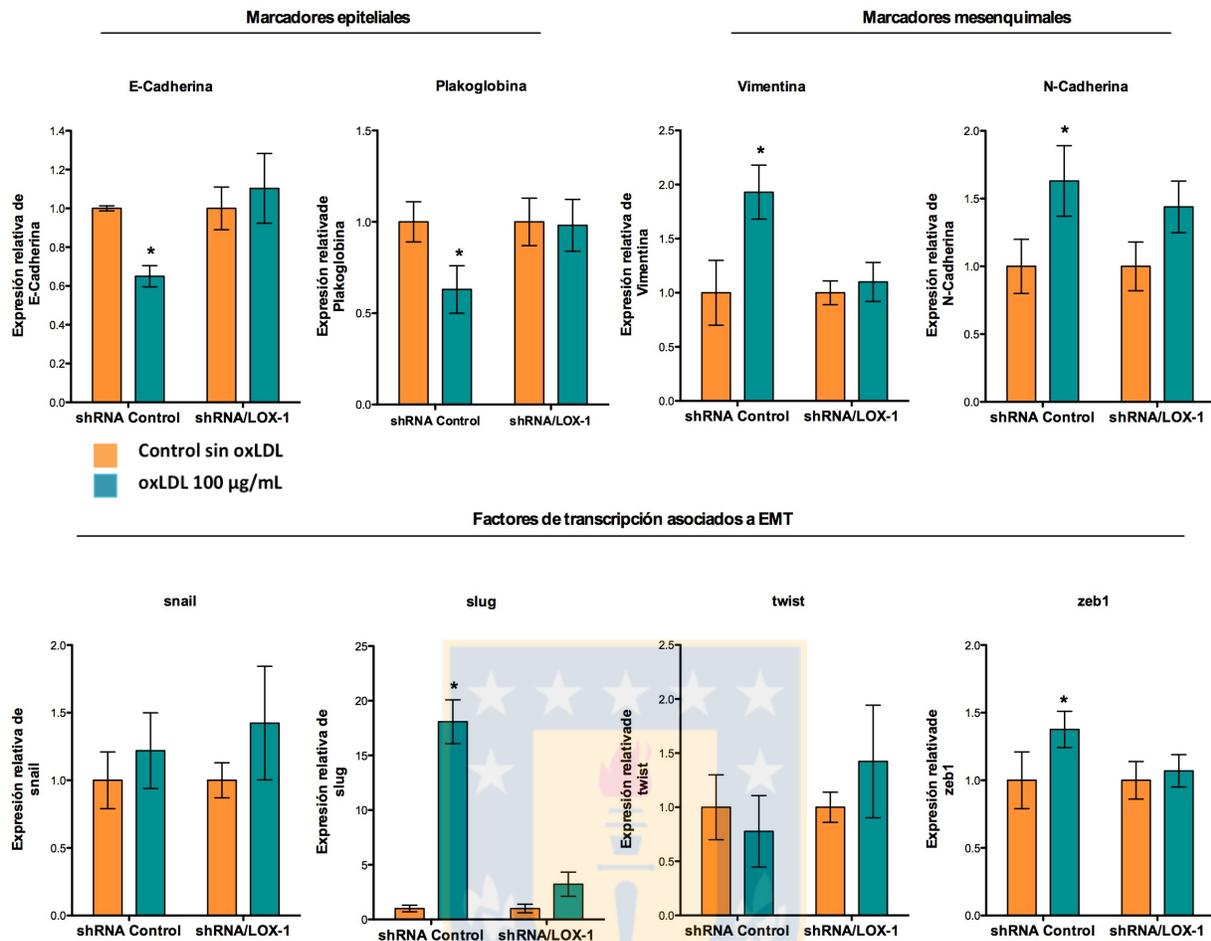




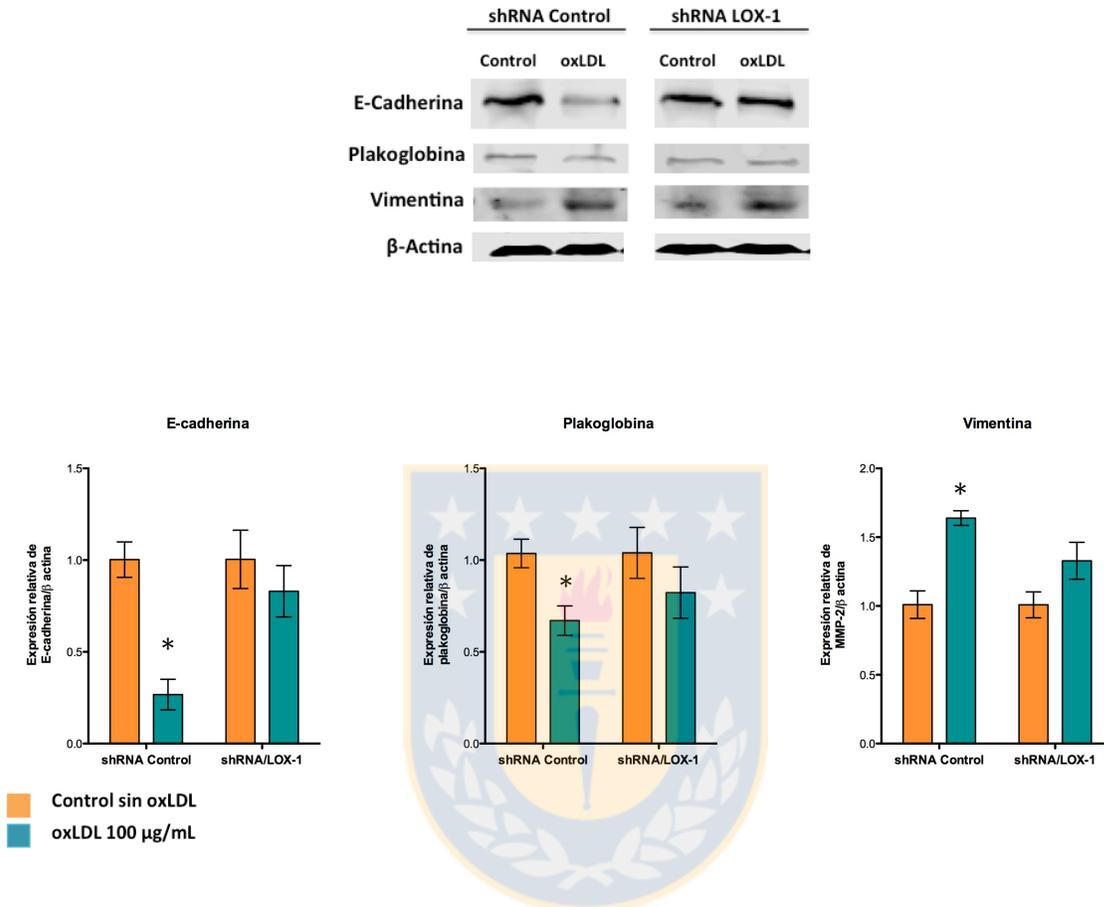
**Figura 33. Expresión relativa de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata LNCaP transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y tratadas con oxLDL.** Análisis mediante PCR tiempo real del efecto de oxLDL en la expresión relativa de marcadores de EMT (E-Cadherina, plakoglobina, vimentin, N-cadherina, *snail*, *slug*, *twist* y *zeb-1*). El análisis se realizó desde ARN total de células de cáncer de próstata LNCaP transfectadas con 50 picomoles de siRNA contra el receptor LOX-1 o un siRNA control durante 48 horas y posteriormente tratadas con 100 µg/mL oxLDL por 24 horas. Las gráficas representan las medias de la expresión relativa de los marcadores de EMT determinados con el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como normalizador la expresión de  $\beta$ -actina  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$



**Figura 34. Expresión relativa de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata DU-145 transfectadas con un siRNA contra el receptor LOX-1 y tratadas con oxLDL.** Análisis mediante PCR tiempo real del efecto de oxLDL en la expresión relativa de marcadores de EMT (E-Cadherina, plakoglobina, vimentin, N-cadherina, *snail*, *slug*, *twist* y *zeb-1*). El análisis se realizó desde ARN total de células de cáncer de próstata DU-145 transfectadas con 50 picomoles de siRNA contra el receptor LOX-1 o un siRNA control durante 48 horas y posteriormente tratadas con 100 µg/mL oxLDL por 24 horas. Las gráficas representan las medias de la expresión relativa de los marcadores de EMT determinados con el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como normalizador la expresión de  $\beta$ -actina  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$



**Figura 35. Expresión relativa de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con oxLDL.** Análisis mediante PCR tiempo real del efecto de oxLDL en la expresión relativa de marcadores de EMT (E-Cadherina, plakoglobina, vimentina, N-cadherina, *snail*, *slug*, *twist* y *zeb-1*). El análisis se realizó desde ARN total de células de cáncer de próstata C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con 100 µg/mL oxLDL por 24 horas. Las gráficas representan las medias de la expresión relativa de los marcadores de EMT determinados con el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como normalizador la expresión de  $\beta$ -actina  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$



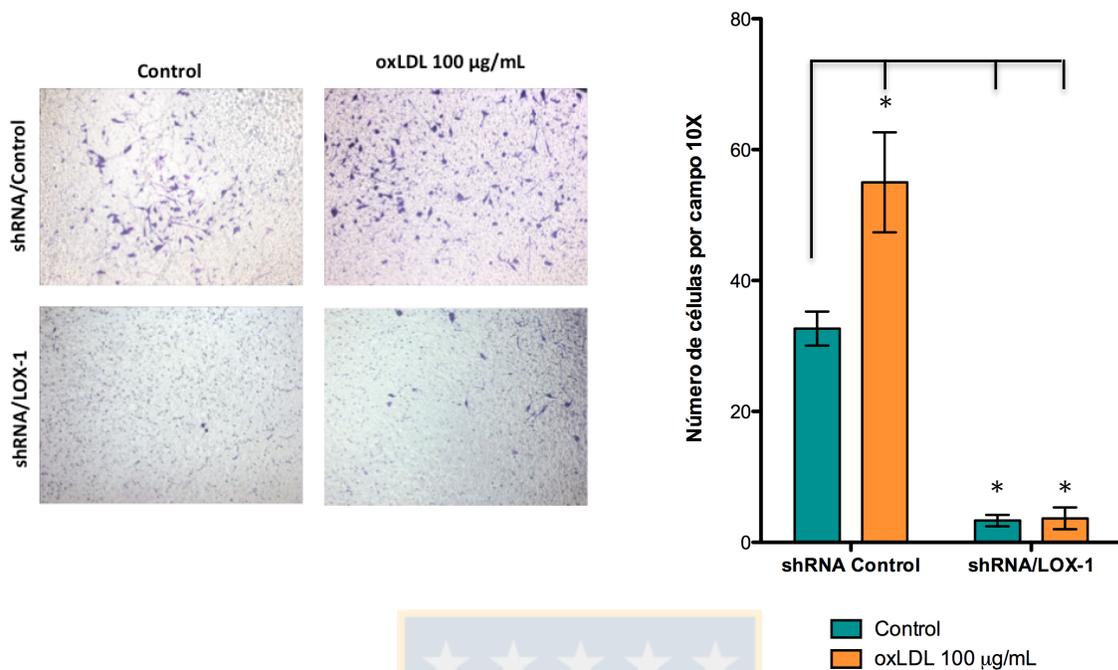
**Figura 36. Expresión relativa de marcadores EMT en las líneas celulares estables cáncer de próstata C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con oxLDL.** Se analizaron por western blot la expresión relativa de los marcadores de EMT (E-Cadherina, plakoglobina y vimentina) en muestras de proteínas totales de las líneas celulares estables C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA-control tratadas con oxLDL (100  $\mu$ g/mL) durante 48 horas. Las gráficas representan las medias de las densidades de banda de los marcadores de EMT normalizada por  $\beta$ -actina  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

### **13.3.3. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve la trans migración de células de cáncer de próstata.**

Con la finalidad de determinar si la activación de LOX-1 promueve la migración celular, un proceso fundamental en la EMT y la invasión tumoral, analizamos el efecto de oxLDL en la migración de las células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA-control tratadas con oxLDL 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mediante estudios de migración celular en *transwells*. Se sembraron 50.000 células en el pocillo superior de un *transwell* y luego de 24 horas las células fueron tratadas con oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 48 horas. Se determinó que el tratamiento con oxLDL incrementa significativamente la trans migración de células C4-2/shRNA-control respecto a la línea celular sin tratamiento con oxLDL. Sin embargo, el tratamiento con oxLDL en la línea celular C4-2/shRNA-LOX-1 no presentó cambios significativos en la trans migración celular con respecto a la línea celular sin tratamiento con oxLDL. Además, determinamos que la capacidad de migración celular decrece de forma significativa en las células C4-2/shRNA-LOX-1 en comparación con la línea C4-2/shRNA control (figura 37).

### **13.3.4. La oxLDL incrementa la invasión celular en células de cáncer a través del receptor LOX-1.**

Para determinar la función de oxLDL y LOX-1 en la invasión de células de cáncer de próstata se realizó el ensayo de invasión en 2 dimensiones denominado ensayo de curación de la herida. Este ensayo se basa en la capacidad de las células de invadir una herida formada en un cultivo celular *in vitro*. Células LNCaP, C4-2 y DU-145 fueron cultivadas hasta confluencia para luego generar una herida en los cultivos celulares.



**Figura 37. Análisis de migración de células de cáncer de próstata tratadas con oxLDL.** Células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control fueron cultivadas en *transwells* de 8 µm y tratadas con oxLDL (100 µg/mL) durante 48 horas. Posteriormente la células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta al 0,02% p/v. Las figuras muestran las microfotografías tomadas en el microscopio Olympus IX81 DSU con un aumento de 10X. La gráfica representa las medias del número de células por campo ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

Posteriormente, las células se trataron con oxLDL 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 48 horas. Se determinó que las células LNCaP, C4-2 y DU-145 tratadas con oxLDL aumentaron significativamente su capacidad de invasión comparado con las líneas celulares sin tratamiento con oxLDL (figura 38). Además, se determinó que el tratamiento con oxLDL solo genera un aumento en la invasión celular de la línea la línea C4-2/shRNA-control, sin generar cambios significativos en la invasión de la línea celular estable C4-2/shRNA-LOX-1 en comparación con la línea celular sin tratamiento con oxLDL. Estos resultados sugieren que oxLDL promueve la invasión tumoral en células de cáncer de próstata a través de su receptor LOX-1 (figura 39).

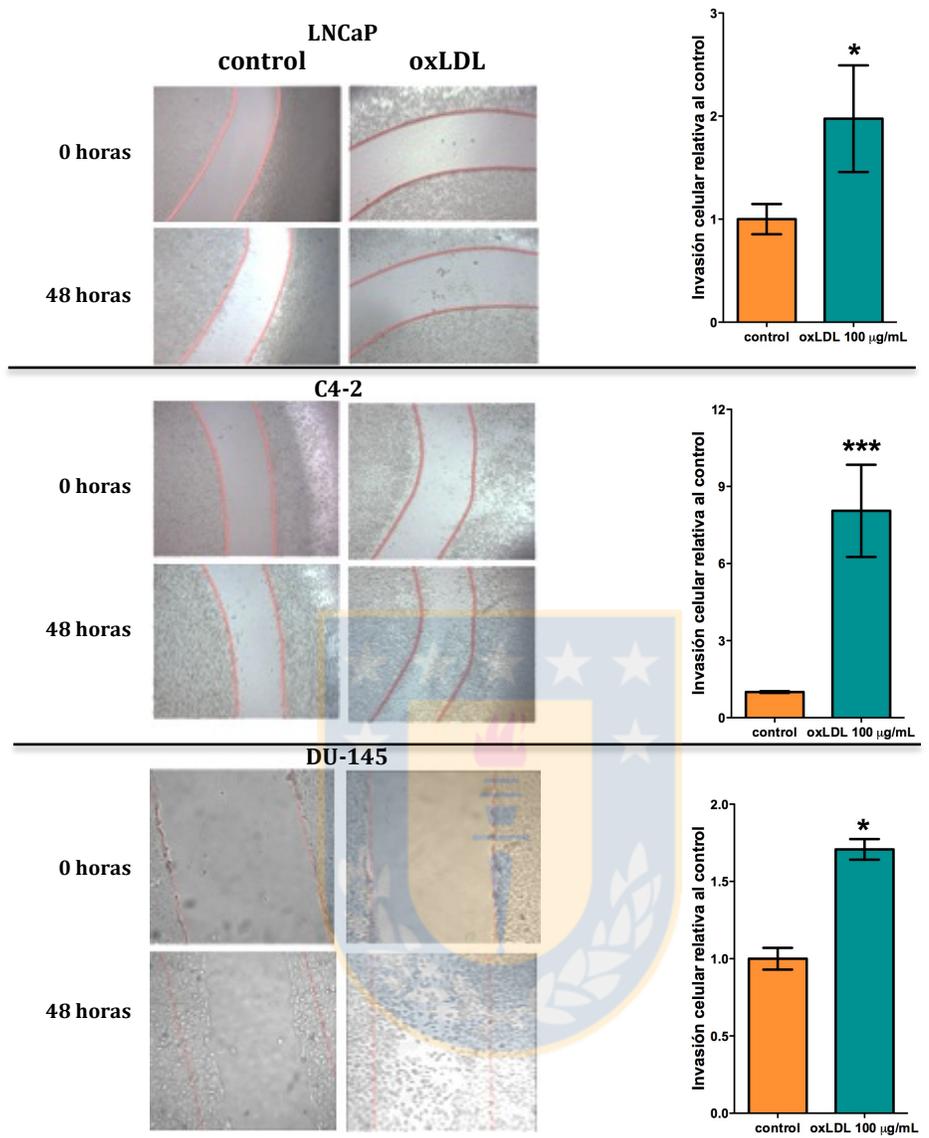
#### **13.3.5. La activación de LOX-1 por la oxLDL incrementan la actividad gelatinasa de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9.**

Otro de los procesos asociados a la EMT es el aumento de la actividad y la secreción de metaloproteinasas de matriz, las que favorecen la invasión y angiogénesis tumoral. Para determinar la función de oxLDL y LOX-1 en la actividad de dos importantes metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9, las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y DU-145 se trataron con concentraciones crecientes de oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 48 horas. Posteriormente, los medios de cultivo fueron colectados y concentrados para analizar la actividad de MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía en geles de poliacrilamida con 0,1% de gelatina. Se determinó que los tratamientos con oxLDL aumentan de forma significativa la actividad de MMP-2 y MMP-9, en forma dependiente de las concentraciones de oxLDL utilizadas para las tres líneas

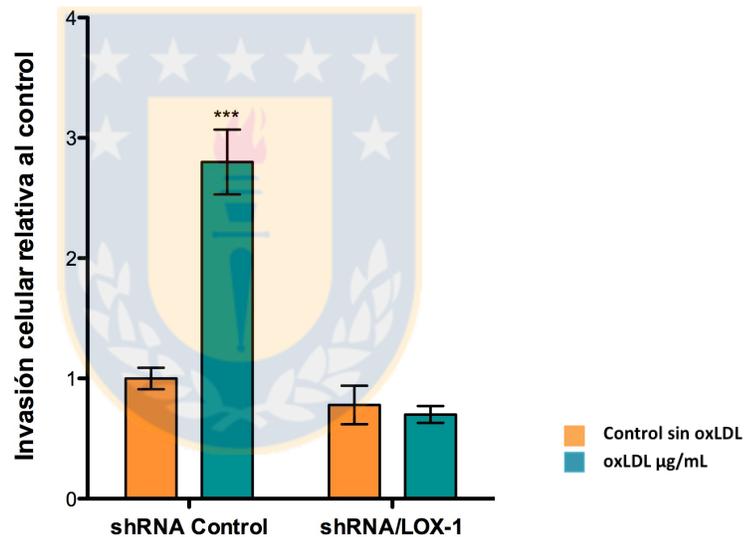
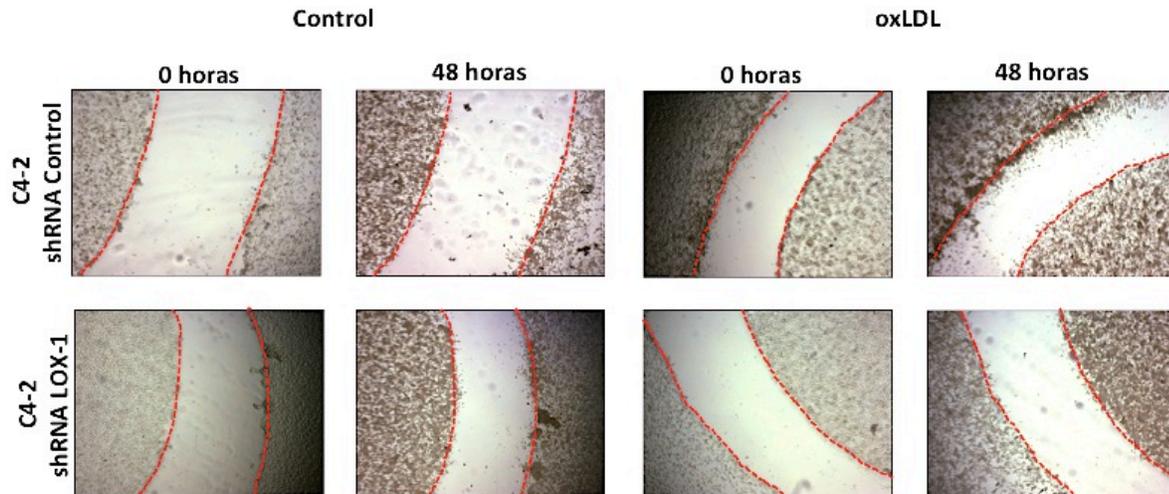
celulares estudiadas. De igual manera determinamos que la mayor actividad de MMP-2 y MMP-9 se observó para la concentración de 100 µg/mL de oxLDL (figura 40).

Además, se determinó que los tratamientos con oxLDL solo generan aumentos significativos en la actividad de MMP-2 y MMP-9 en los medios condicionados provenientes de la línea C4-2/shRNA-control, pero no se observaron cambios significativos en la actividad MMP-2 y MMP-9 de los medios condicionados de células C4-2/shRNA-LOX-1 en comparación con las líneas celulares no tratadas con oxLDL. Esto sugiere que la activación de LOX-1 por oxLDL incrementa la actividad de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9 en células humanas de cáncer de próstata (figura 41).

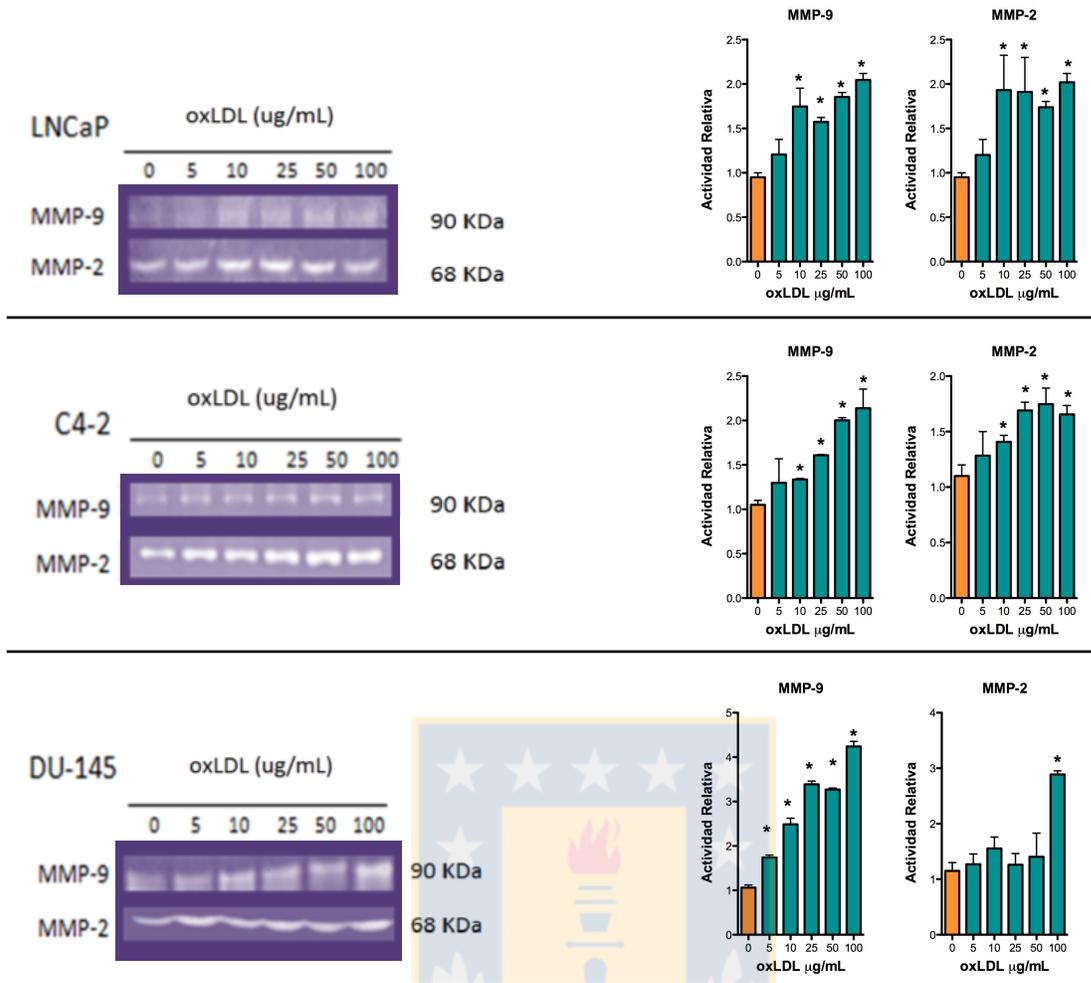




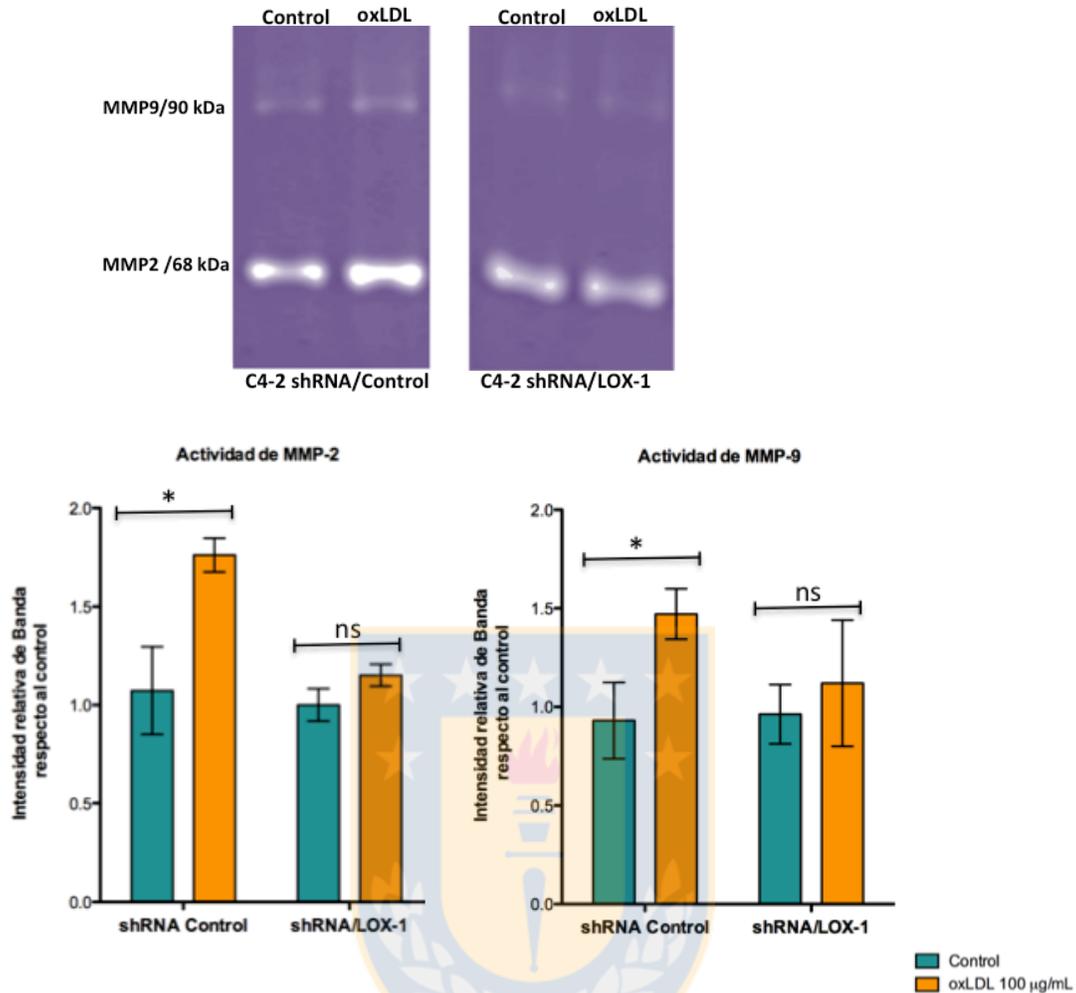
**Figura 38. Ensayo de invasión celular “curación de la herida” de células LNCaP, C4-2 y DU-145 tratadas con oxLDL.** Células LNCaP, C4-2 y DU-145 fueron sembradas sobre placas de 24 pocillos pre-tratadas con fibronectina, se les realizó una herida y se trataron con oxLDL (100 µg/mL). Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio confocal Olympus I81X DSU con una magnificación de 20X. La gráfica representa las medias del número de células que invaden el espacio sin células  $\pm$  s.d. de tres experimentos independientes. Análisis de *t de student* \*  $P \leq 0,05$ .



**Figura 39. Ensayo de invasión celular “curación de la herida” de células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control.** Células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control fueron sembradas sobre placas de 24 pocillos con fibronectina, se les realizó una herida y se trataron con 100 ug/mL de oxLDL y sin oxLDL. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio confocal Olympus IX81 DSU con una magnificación de 20X. La gráfica representa las medias del número de células que invaden el espacio generado en la herida del cultivo celular  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*\*\*  $P \leq 0,001$ .



**Figura 40. Análisis de actividad gelatinasa de las metaloproteínas de matriz 2 y 9 en medios condicionados de células LNCaP, C4-2 y DU-145 tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL.** Células de cáncer de próstata fueron incubadas con oxLDL (0, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 48 horas. Luego los medios de cultivos fueron colectados y concentrados para analizar la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 por zimografía en gel de poliacrilamida al 10% y 0.1% de gelatina. Las gráficas representan la densidad de banda relativa al control de la actividad gelatinasa de MMP-9 y MMP-2  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .



**Figura 41. Análisis de actividad gelatinasa de metaloproteínas de matriz en medios condicionados de células C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1.** El análisis de actividad gelatinasa mediante zimografía de las metaloproteínas de matriz MMP-2 y MMP-9 en medios de cultivo de células C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1 tratadas con oxLDL (100 µg/mL) durante 48 horas. La gráfica representa la densidad de banda relativa al control de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

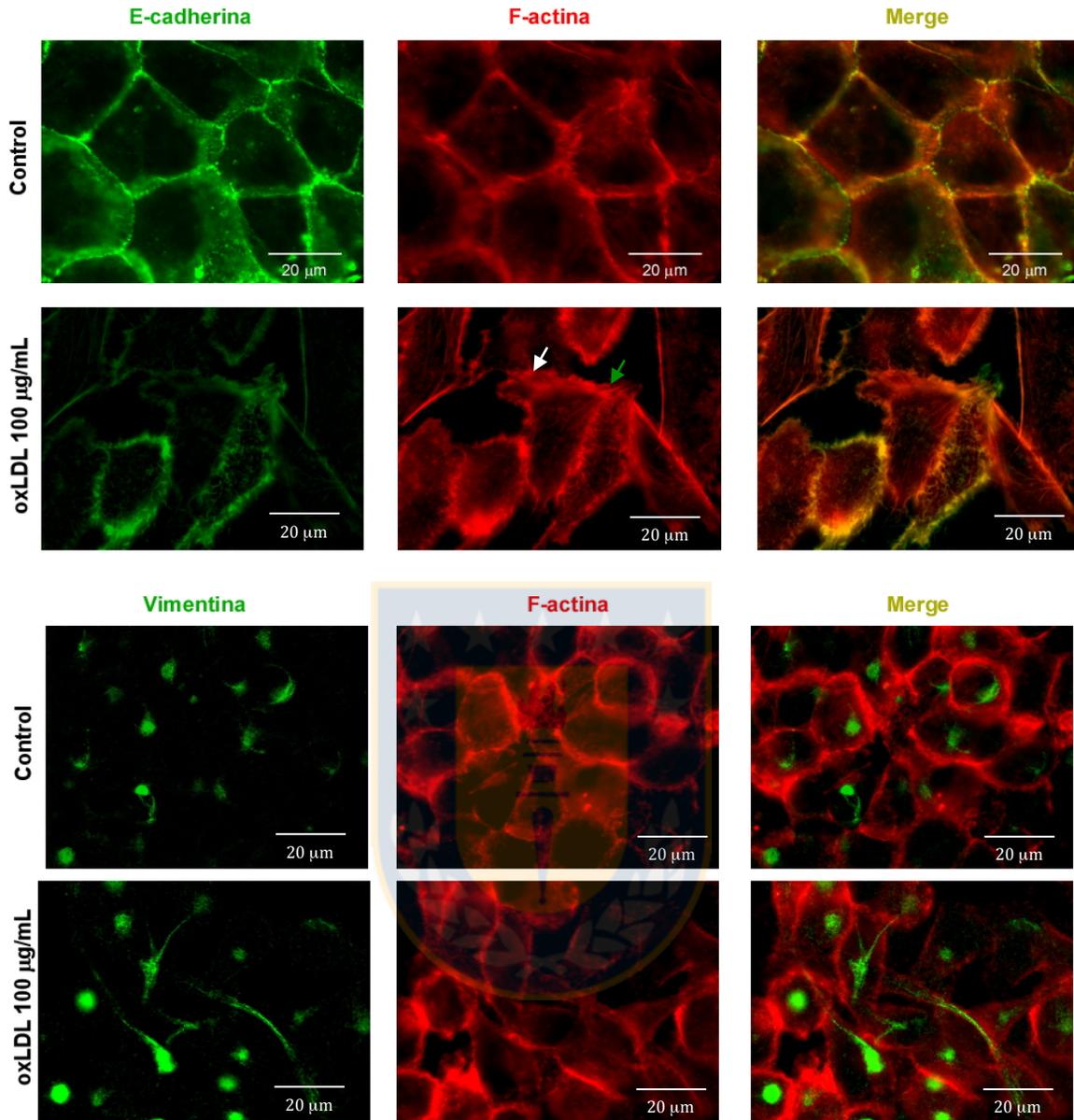
### **13.3.6. La activación de LOX-1 por oxLDL promueve una reestructuración del citoesqueleto de actina en el proceso de transición epitelio mesenquimal.**

La reestructuración del citoesqueleto de actina favorece los procesos de motilidad celular durante la progresión tumoral, promoviendo la invasión celular hacia tejidos subyacentes. Para determinar la función de oxLDL y su receptor LOX-1 en la reestructuración del citoesqueleto de actina de células humanas de cáncer de próstata se analizó, a través de inmunocitoquímica y utilizando faloidina Texas-Red, la reestructuración del citoesqueleto de actina en el proceso de EMT inducido por oxLDL. Las células de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y DU-145 fueron cultivadas sobre vidrios hasta una confluencia del 80% y fueron tratadas con oxLDL (100 µg/mL) durante 48 horas. Se determinó que las células LNCaP, C4-2 y DU-145 tratadas oxLDL generan una reestructuración evidente del citoesqueleto de actina en conjunto con la pérdida de interacciones célula-célula. Se observó además, la formación de lamelipodios y filopodios en la células tratadas con oxLDL en comparación a la distribución cortical de actina y la presencia de interacciones célula-célula en las líneas sin tratamiento (figuras 42, 43, 44 y 45).

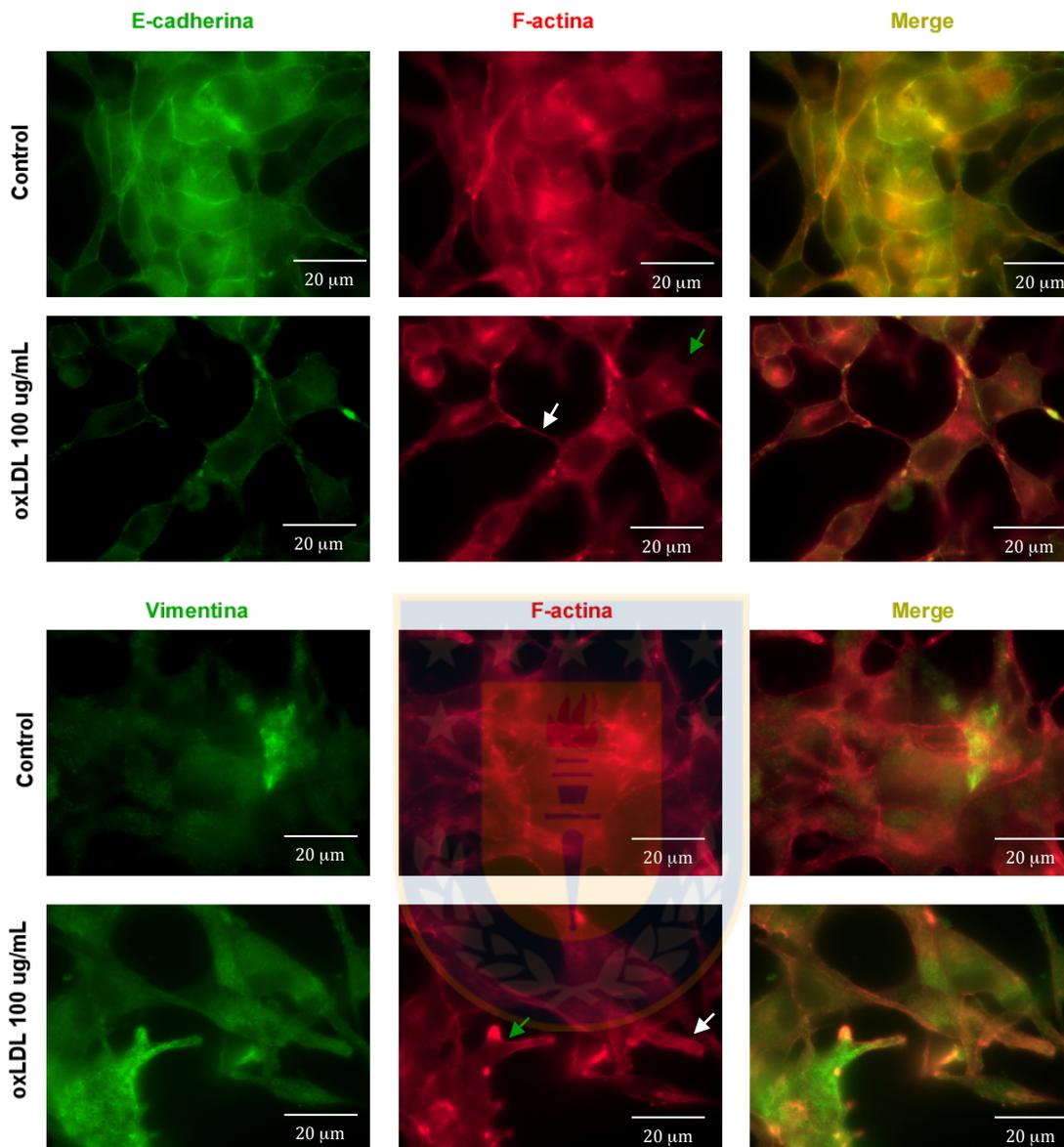
Además, se determinó que junto a la reestructuración del citoesqueleto existe una disminución apreciable en la inmunoreactividad de E-cadherina y un aumento en la inmunoreactividad de vimentina en las tres líneas celulares expuestas a oxLDL en comparación a las líneas sin tratamiento (figuras 42, 43, 44 y 45). Para determinar si los fenómenos inducidos por oxLDL en la reestructuración del citoesqueleto son mediados por el receptor LOX-1,

analizamos el efecto de oxLDL en las líneas celulares estables C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1. Determinamos que el tratamiento con oxLDL indujo la reestructuración del citoesqueleto de actina con la concomitante generación de filopodias y lamelipodias, y la disminución de la inmunoreactividad de E-cadherina y el aumento de la inmunoreactividad de vimentina en la línea celular C4-2/shRNA-control. Sin embargo, el efecto de oxLDL en la inducción de estos procesos fue prevenido al utilizar la línea celular C4-2/shRNA-LOX-1 (figuras 44 y 45). Esto nos sugiere que la activación de LOX-1 por la oxLDL en células humanas de cáncer de próstata promueve la reestructuración del citoesqueleto de actina durante el proceso de EMT generando morfotipos celulares con capacidad de migración e invasión.

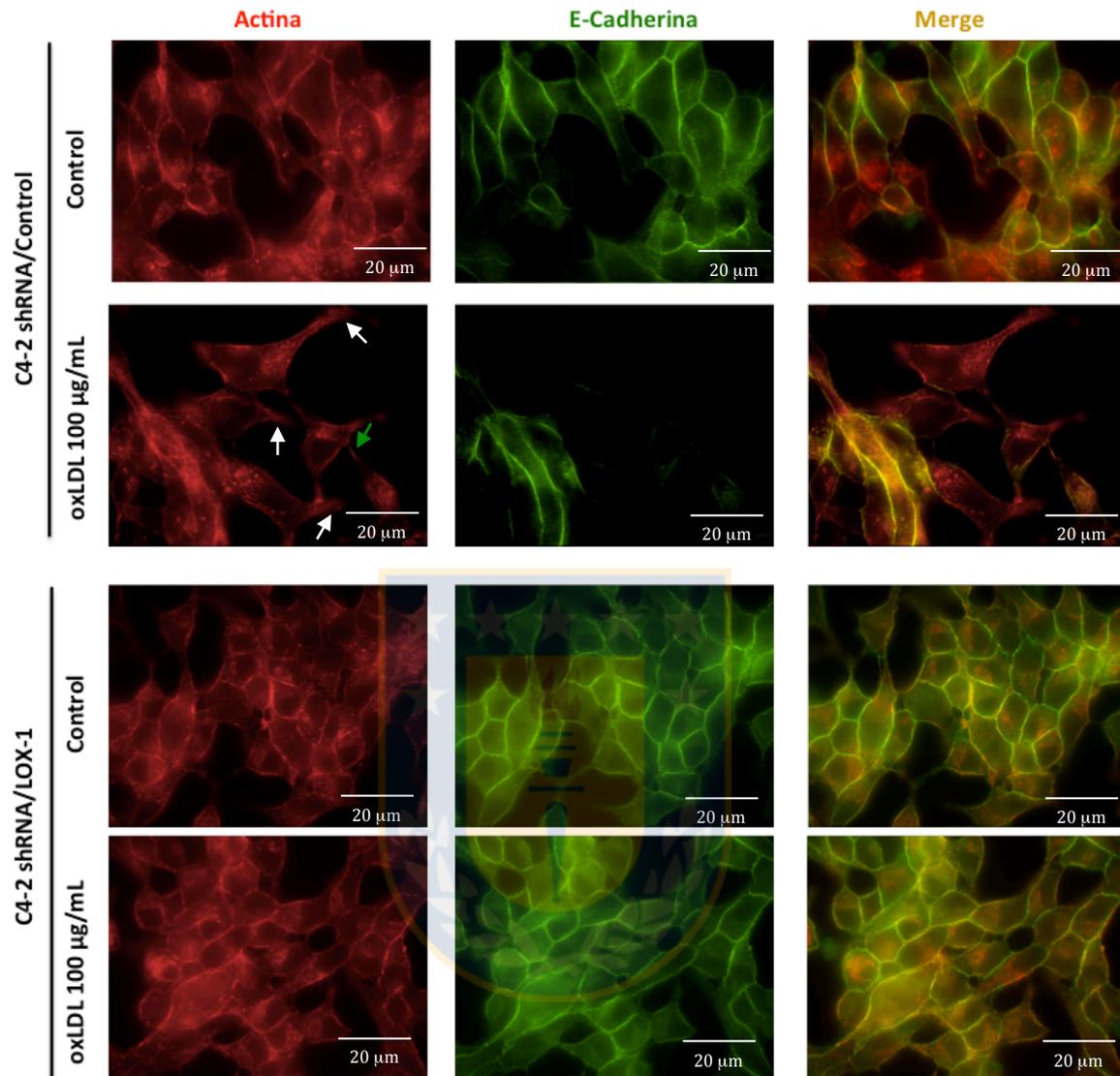




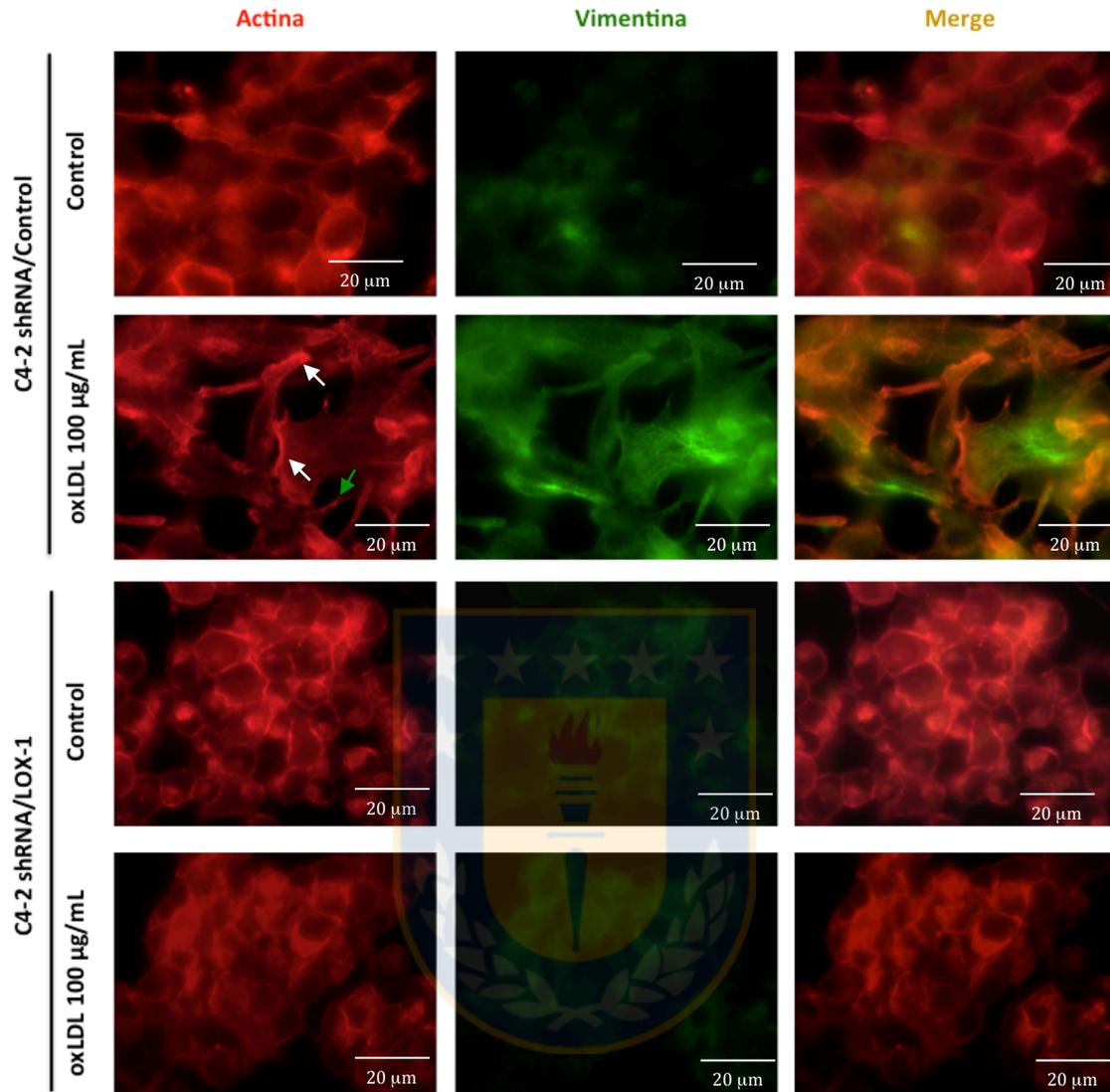
**Figura 42. Inmunodetección de E-cadherina, vimentina y F-actina en células DU-145 tratadas con oxLDL.** Las células de cáncer de próstata DU-145 confluentes, se trataron con oxLDL (100 µg/mL) por 48 horas. La inmunodetección de E-cadherina se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-E-cadherina (1/100) y para vimentina se utilizó el anticuerpo policlonal anti-vimentina (1/100), se utilizaron los anticuerpos secundario anti-IgG de cabra o ratón conjugado con FITC (1/1000). Para la detección del citoesqueleto de actina se utilizó una unidad de Faloidina Texas/Red. Las microfotografías fueron adquiridas con el microscopio DSU Olympus IX81 utilizando una magnificación de 60X. Las flechas blancas indican la formación de lamelipodias y las fechas verdes la formación de filopodias.



**Figura 43. Inmunodetección de E-cadherina, vimentina y F-actina en células LNCaP tratadas con oxLDL.** Las células de cáncer de próstata LNCaP confluentes, se trataron con oxLDL 100 µg/mL por 48 horas. La inmunodetección de E-cadherina se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-E-cadherina (1/100) y para vimentina se utilizó el anti cuerpo policlonal anti-vimentina (1/100), se utilizaron los anticuerpos secundario anti-IgG de cabra o ratón conjugado con FITC (1/1000). Para la detección del citoesqueleto de actina se utilizó 1 unidad de Faloidina Texas/Red. Las microfotografías fueron adquiridas con el microscopio DSU Olympus IX81 utilizando una magnificación de 60X. Las flechas blancas indican la formación de lamelipodias y las fechas verdes la formación de filopodias.



**Figura 44. Inmunodetección de E-cadherina y F-actina en células C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1 tratadas con oxLDL.** Las células C4-2/shRNA-control, C4-2/shRNA-LOX-1 confluentes, se trataron con oxLDL 100 µg/mL por 48 horas. La inmunodetección de E-cadherina se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-E-cadherina (1/100) y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC (1/1000). Para la detección del citoesqueleto de actina se utilizó 1 unidad de Faloidina Texas/Red. Las microfotografías fueron adquiridas con el microscopio DSU Olympus IX81 utilizando una magnificación de 60X. Las flechas blancas indican la formación de lamelipodios y las flechas verdes la formación de filopodios..

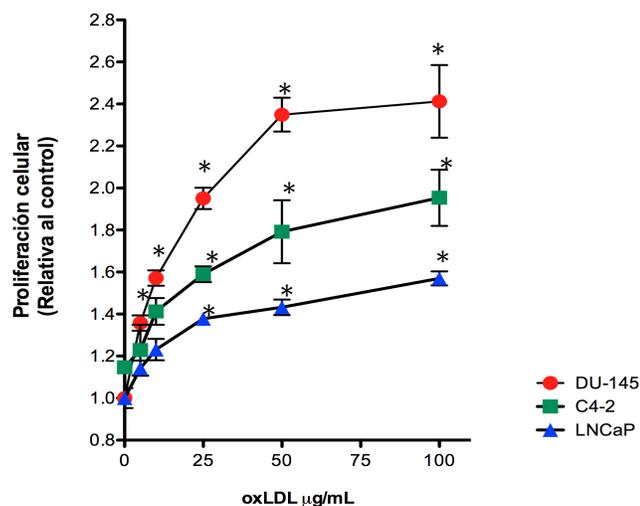
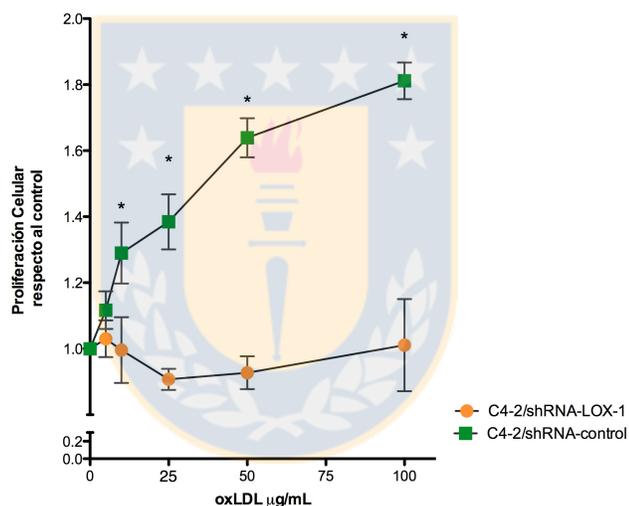


**Figura 45. Inmunodetección de vimentina y F-actina en células C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1 tratadas con oxLDL.** Las células C4-2/shRNA-control, C4-2/shRNA-LOX-1 confluentes, se trataron con oxLDL 100 µg/mL por 48 horas. La inmunodetección de vimentina realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-vimentina (1/100) y el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado con FITC (1/1000). Para la detección del citoesqueleto de actina se utilizó 1 unidad de Faloidina Texas/Red. Las microfotografías fueron adquiridas con el microscopio DSU Olympus IX81 utilizando una magnificación de 60X. Las flechas blancas indican la formación de lamelipodias y las fechas verdes la formación de filopodias.

### **13.3.7. La activación de LOX-1 por la oxLDL promueve la proliferación de células humanas de cáncer de próstata.**

Para determinar si la oxLDL promueve la proliferación en células de cáncer de próstata, las líneas LNCaP, C4-2 y DU-145 fueron tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL (5, 10, 25, 50, 100 µg/mL) durante 48 horas y se analizó la proliferación celular mediante de la técnica de MTT. Se determinó que los tratamientos con oxLDL incrementan significativamente la proliferación celular en forma dependiente de las concentraciones de oxLDL utilizadas. Para la línea celular DU-145 observamos incrementos de 1.3, 1.6 , 2.0, 2.4 y 2,7 veces para las concentraciones de oxLDL de 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL respectivamente en comparación a la línea control sin tratamiento. De igual manera, para la línea C4-2 observamos incrementos de 1.1, 1.5, 1.6, 1.9 y 2.1 veces respecto al control sin tratamiento, y para LNCaP observamos incrementos de 1.2, 1.2, 1.4, 1.5 y 1.6 veces respecto al control sin tratamiento con oxLDL (figura 46A).

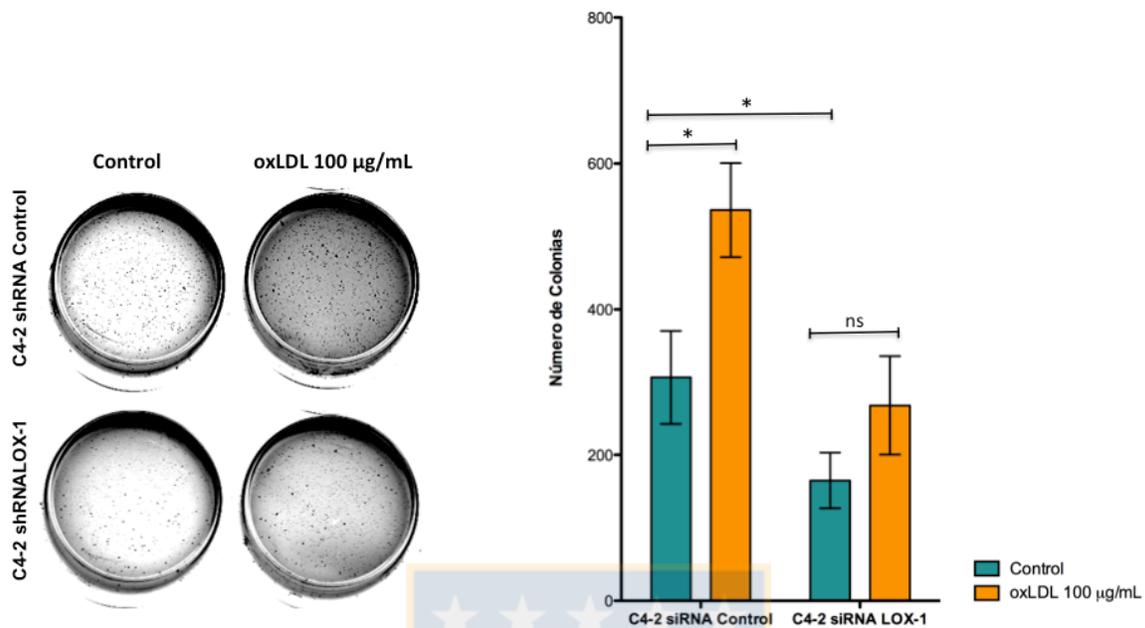
Para determinar si los efectos en la estimulación de la proliferación generada por oxLDL es mediada por LOX-1 analizamos los efectos de esta proteína modificada en la proliferación celular de los modelos C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1. Determinamos que el tratamiento con oxLDL induce la proliferación celular de la línea C4-2/shRNA-control en forma dependiente de las concentraciones de oxLDL utilizadas. Interesantemente, estos efectos en la proliferación celular fueron prevenidos al utilizar la línea celular C4-2/shRNA-LOX-1 para todas las concentraciones de oxLDL utilizadas (figura 46B). Estos resultados sugieren que la activación de LOX-1 por la oxLDL induce la proliferación de células humanas de cáncer de próstata.

**A****B**

**Figura 46. Análisis de proliferación en células de cáncer de próstata tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL. A)** las Células LNCaP, C4-2 y DU-145 se trataron con concentraciones crecientes de oxLDL (5, 10, 25, 50, 100 µg/mL) durante 48 horas y se analizó la proliferación celular a través de la técnica de MTT. **B)** Células C4-2/shRNA-control y C4-2/shRNA-LOX-1 se trataron con oxLDL (5, 10, 25, 50, 100 µg/mL) durante 48 horas y se analizó la proliferación celular a través de la técnica de MTT. Las gráficas representan el promedio de la tasa de proliferación celular para cada una de las concentraciones de oxLDL ensayadas respecto del control sin tratamiento con oxLDL  $\pm$  desviación estandar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

### **13.3.8. La activación de LOX-1 por oxLDL incrementa el potencial tumorigénico de células de cáncer de próstata.**

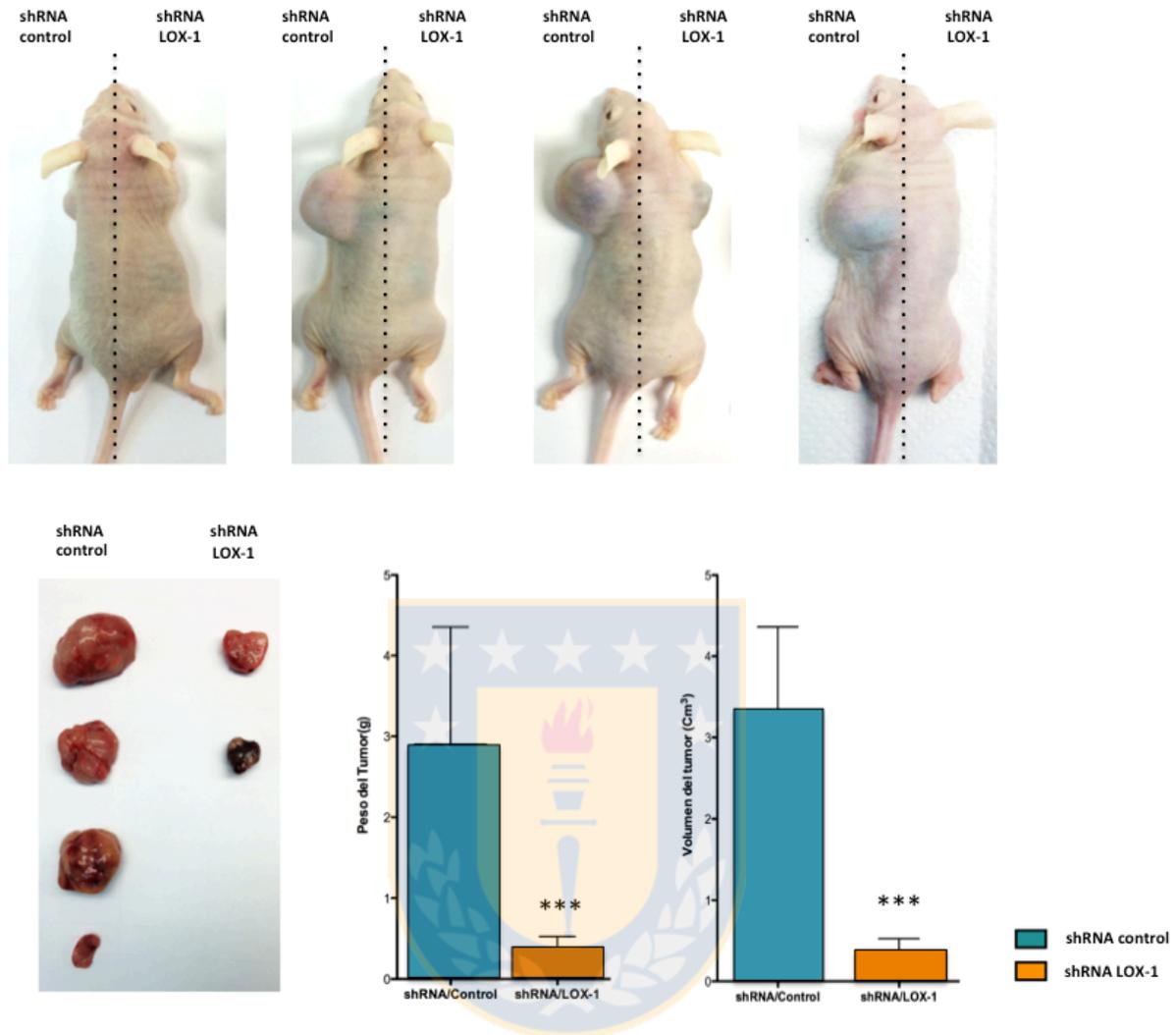
Para determinar la función de la oxLDL y su receptor LOX-1 en el potencial tumorigénico de células de cáncer de próstata se realizaron estudios de crecimiento celular independiente de anclaje con el método de agar suave. Se incubaron 5000 células C4-2/shRNA-control o C4-2/shRNA-LOX-1 con oxLDL (100 µg/mL) durante 1 hora. Posteriormente las células fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado con SBF (10%), agarosa (0,35%) y oxLDL (25 µg/mL) para las condiciones con tratamiento, y se sembraron en placas de cultivo y se incubaron por 14 días. Se determinó que los tratamientos con oxLDL incrementan de forma significativa el número de colonias formadas de la línea celular C4-2/shRNA-control respecto al control sin tratamiento con oxLDL. Además, se determinó que la línea celular C4-2/shRNA-LOX-1 no presenta cambios significativos entre las células tratadas con oxLDL o los controles sin tratamiento. De igual manera, se determinó que el número de colonias decrece de forma significativa en la línea celular que presenta una disminución en la expresión de LOX-1 (C4-2/shRNA-LOX-1) en comparación con la línea que expresa un shRNA control (C4-2/shRNA-control) (figura 47). Estos resultados nos permiten postular, que la oxLDL podría ser un factor tumorigénico capaz de promover el crecimiento tumoral a través de activación de LOX-1. Además, al observar una disminución significativa de en el número de colonias de la línea celular C4-2/shRNA-LOX-1 en comparación al control postulamos que LOX-1 por sí solo podría ser necesario para el crecimiento tumoral.



**Figura 47. Análisis del potencial tumorigénico de células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA control tratadas con oxLDL.** Ensayo de agar suave de células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA-control tratadas con oxLDL. Las líneas celulares se pre-trataron con oxLDL 100 µg/mL durante 2 horas y luego se sembraron en agar semisólido al 0,2 % y oxLDL 25 µg/mL durante 14 días. Posteriormente las colonias se tiñeron con cristal violeta al 0,02 % y las colonias se registraron con el equipo de detección infrarroja ODISSEY CLX LI-COR, a una longitud de onda excitación 660 nm y una emisión de 680nm. El total de colonias se cuantificó utilizando el software *ImageJ* con *plugin* para cuantificación automatizada de colonias. La gráfica representa el número de colonias ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

### **13.3.9. el receptor LOX-1 es determinante para el crecimiento de xenograft subcutáneos de células de cáncer de próstata C4-2.**

Los ensayos de potencial tumorigénico evidenciaron que LOX-1 podría ser necesario para el crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata C4-2. Para determinar la relevancia de LOX-1 en el crecimiento tumoral *in vivo* se inocularon  $1 \times 10^6$  de células C4-2/shRNA-control en el dorso superior derecho y  $1 \times 10^6$  de células C4-2/shRNA-LOX-1 el dorso superior izquierdo de ratones *nude* machos de 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer por 5 semanas y se cuantificó el tamaño y volumen tumoral. Se determinó que el tamaño y volumen tumoral es significativamente menor para la línea celular C4-2/shRNA-LOX-1 en comparación con la línea celular C4-2/shRNA-control. Estos resultados demuestran que LOX-1 es un importante componente para el crecimiento tumoral de modelos de células humanas de cáncer de próstata de la línea C4-2 (figura 48).



**Figura 48. Ensayo de crecimiento tumoral de xenografts subcutáneos de células C4-2/shRNA-LOX-1 y C4-2/shRNA-control en ratones *nude*.** Los xenografts se generaron mediante la inoculación de  $1 \times 10^6$  de células C4-2/shRNA-control o C4-2/shRNA-LOX-1 en las regiones dorsales derecha e izquierda de ratones *nude* de 6 semanas de edad. Los xenografts crecieron durante 5 semanas para posteriormente cuantificar la masa y volumen tumoral en cada uno de los casos. Las gráficas representan la masa del tumor o el volumen del tumor  $\pm$  la desviación estándar con una  $n$  experimental de 4 animales. Análisis *t student* \*\*\*  $P \leq 0,001$ ,

## 14.- DISCUSIÓN

La expresión y función del receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada (LOX-1), se asocia a patologías como disfunción endotelial, aterosclerosis y obesidad [129-131]. Varios de los aspectos clínicos de estas patologías como el aumento en los niveles de colesterol LDL y la forma oxidada de esta lipoproteína (oxLDL) se relacionan con la progresión tumoral y la metástasis en cáncer de próstata [78, 132, 133]. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que LOX-1 se encuentra expresado en células de cáncer de próstata lo cual a sido corroborado por otros grupos de investigación [30, 134]

En esta tesis planteamos como hipótesis que: *“ El receptor LOX-1 es sobre-expresado en células humanas de cáncer próstata y su activación por su ligando la oxLDL promueve la angiogénesis e invasión, dos procesos asociados a la progresión tumoral de este tipo de cáncer “*. Nuestros resultados han permitido validar de forma consistente esta hipótesis, demostrando que dos importantes componentes asociados a obesidad como son oxLDL y LOX-1 promueven la angiogénesis, la invasión y el crecimiento tumoral de células humanas de cáncer de próstata.

### 14.1. El receptor LOX-1 es sobre expresado en cáncer de próstata.

El receptor LOX-1 es una proteína de membrana tipo II que fue inicialmente identificado como el principal receptor para oxLDL en células endoteliales [15]. Estudios subsecuentes demostraron que este receptor también está expresado en monocitos, plaquetas, cardiomiocitos, células musculares lisas vasculares, tejido renal, pulmonar, neuronal, placentario, médula y aorta. Además, se demostró que la expresión de LOX-1 es mínima en algunos tejidos y células tales como:

linfocitos, bazo, timo, ganglios linfáticos y glándula prostática [17]. Si bien la expresión de LOX-1 bajo condiciones fisiológicas es mínima, su expresión se induce bajo condiciones fisiopatológicas como la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión, la isquemia miocárdica, aterosclerosis, difusión endotelial, dislipidemia, obesidad y cáncer [30, 135-141] .

En base a esta información evaluamos la expresión del receptor LOX-1 en adenocarcinomas prostáticos, tejido metastásico de cáncer de próstata y en líneas célula de cáncer prostático humano. Nuestros resultados demostraron que LOX-1 se encuentra sobre expresado se encuentra sobre-expresado en adenocarcinomas prostáticos y tejido metastásico de pacientes con cáncer de próstata y en todas las líneas celulares de cáncer de próstata analizadas.

Los resultados obtenidos por otros grupos de investigación respaldan nuestro hallazgo, por ejemplo Hirsh y colaboradores en el año 2010 describen la expresión de LOX-1 en adenocarcinomas mamarios y prostáticos de estadios clínico patológicos avanzados y demuestran por primera vez que LOX-1 está involucrado en procesos de transformación celular en cáncer de mama [30]. Igualmente los análisis comparativos de perfiles de expresión de cáncer colorectal metastásico sincrónico y metacrónico muestran que el receptor LOX-1 se encuentra sobre-expresado en ambos tipos de cáncer y que este podría tener un rol crucial en la metástasis del cáncer colorectal [142].

Por otra parte, se ha descrito que los niveles de expresión de LOX-1 en combinación con el índice de masa corporal, pueden ser utilizados para la prognosis de pacientes con cáncer de pulmón de células escamosas no-pequeñas [143]. Igualmente, la triada de genes *LOX-1*, *CXCL11* y *ADAMDEC1*, se describen

como marcadores predictivos validados para determinar la condición clínico-patológica de pacientes con cáncer gástrico [144].

En consecuencia, la sobre expresión de LOX-1 que observamos en células y tejido de cáncer próstata podría no ser un fenómeno inherente a este tipo de neoplasia, sino un evento recurrente observado en otros tipo de neoplasias como el cáncer de mama, colorectal, pulmón de células no-pequeñas y gástrico. Una de las razones que podría explicar este fenómeno es que muchas de las moléculas presentes en el microambiente tumoral de varios tipos cáncer como el TNF- $\alpha$ , IL $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , Ang-II y endotelina I [104], inducen la expresión del receptor LOX-1 [20].

#### **14.2. La oxLDL induce la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata humanas.**

Interesantemente, la oxLDL el principal ligando para LOX-1, induce la expresión de este receptor en células endoteliales macrófagos y células musculares lisas [20]. Sin embargo, en células de cáncer próstata la estimulación de la expresión de LOX-1 inducida por oxLDL no ha sido descrita. Es por esto que analizamos sí oxLDL estimula la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata. Nuestros resultados demostraron que oxLDL indujo un aumento significativo en la expresión del receptor LOX-1, en forma dependiente de las concentraciones de oxLDL utilizadas para las tres líneas de cáncer de próstata estudiadas (LNCaP, C4-2 y DU 145). Es importante destacar que en resultados previos de nuestro laboratorio determinamos que concentraciones de oxLDL entre 1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no presentan efectos citotóxicos en las líneas celulares de cáncer de

próstata estudiadas [108].

Además, observamos una expresión incrementada de este receptor en respuesta a la estimulación con oxLDL en las líneas celulares C4-2 y DU 145 en comparación con la línea celular LNCaP, lo cual puede ser atribuido a que los efectos en la sobre expresión de LOX-1 inducidos por oxLDL en varios modelos celulares son mediados por el propio receptor LOX-1 [145]. Específicamente, nosotros identificamos que la línea celular LNCaP presenta un 50% menos en la expresión de LOX-1 en comparación a las líneas celulares C4-2 y DU-145, lo que sugiere una explicación a este fenómeno.

La expresión de LOX-1 inducida por oxLDL ha sido reportada en cultivos celulares de endotelio de aorta bovina tratadas con concentraciones de crecientes de oxLDL (3-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [38]. Del mismo modo, uno de los principales constituyentes liso-fosfolipídicos de la oxLDL, la lisofosfatidilcolina, también induce la expresión de LOX-1 de forma dosis dependiente en un rango de concentraciones entre 1-100  $\mu\text{M}$  en células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas [39]. Lo que respaldaría los hallazgos reportados en la presente tesis.

Estudios epidemiológicos y experimentales relacionan la obesidad con el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer a través de múltiples mecanismos [146, 147]. En este sentido los mecanismos subyacentes al desarrollo de la aterosclerosis asociados a perturbaciones del metabolismo lipídico podrían tener importantes implicaciones en el desarrollo y la progresión del cáncer [30, 63]. Pacientes obesos presentan mayores concentraciones circulante de oxLDL en

comparación con individuos normo peso [126-128]. Aún más, las concentraciones locales oxLDL en condiciones fisiopatológicas como la aterosclerosis aumentan significativamente por la actividad de enzimas que promueven la oxidación de la LDL, incrementando en forma progresiva las concentraciones locales de esta lipoproteína modificadas y exacerbando los mecanismos biológicos promovidos por estas, en la progresión de la aterosclerosis [148]. En este sentido, la expresión y activación de enzimas que promueven la oxidación de LDL, mediante la generación de ROS, como la mieloperoxidasa (MPO) y NADPH oxidasa o enzimas que modifican los fosfolípidos de membrana de la LDL como las lipooxigenasas y fosfolipasas se han identificado en varios tipos de cáncer.

La relación entre el proceso de oxidación de la LDL y el desarrollo tumoral se hace evidente con la sobre expresión de estas enzimas. Por ejemplo, la MPO es una enzima que se expresa principalmente en fagocitos y se secreta después de su activación [149]. Uno de los compuestos distintivos de la actividad de la mieloperoxidasa es la formación de 3-clorotirosina, la cual se encuentra en altas concentraciones en las oxLDL extraída de lesiones ateroscleróticas en comparación con LDL nativa circulante [149]. Se describe una expresión elevada de MPO en células de cáncer de ovario [150] y en células infiltrativas MPO-positivas en cáncer colorectal [151]. Además, algunos polimorfismos de la mieloperoxidasa tales como MPO GA/AA y MPO G463A son descritos como marcadores de susceptibilidad y agresividad en cáncer de pulmón y de próstata [152, 153].

Adicionalmente, el inicio de la oxidación de la LDL por los monocitos activados en la placa aterosclerótica requiere de la producción del ión superóxido

[154]. En este sentido, la familia de NADPH oxidasa (NOX) son las únicas enzimas que generan superóxido como un producto primario y en condiciones de hiperlipidemia la producción de ROS dependientes de NADPH oxidasa se encuentra incrementada [155]. Por otro lado, las células cancerígenas poseen una NADPH oxidasa hiperactiva la cual genera altos niveles de superóxido que son comparable a los niveles de producción de neutrófilos activados [156]. Además, algunas isoformas de NOX y otras oxidasas duales (DUOX) están asociadas a diversos tipos de cáncer. La NOX1 y DUOX2 producen ROS en el tracto gastrointestinal como resultado de procesos inflamatorios crónicos, inducidos por citoquinas como el interferón- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y las interleuquinas 4 y 13. Lo que demuestra que NOX1 y DUOX2 contribuyen al desarrollo de carcinomas colorrectales y pancreáticos en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y pancreatitis crónica [157]. También se reporta que la expresión de NOX4 incrementa en estados fibróticos pre-malignos de carcinomas de pulmón e hígado, y de igual manera, la expresión de NOX5 está aumentada en melanomas malignos, adenocarcinomas asociados a esófago de Barrett y en cáncer de próstata [157, 158].

Las lipoxigenasas se encuentran entre las enzimas más importantes que median la oxidación de LDL [159]. Estas enzimas catalizan la oxigenación de ácidos grasos esterificados, insaturado y poliinsaturados resultando la formación de hidroperóxidos lipídicos. En los macrófagos y en las células endoteliales las lipoxigenasas son responsables del 70 a 80% del total de oxidación de LDL [160, 161]. Varios de los miembros de la familia de lipoxigenasas se sobre expresan en diferentes tipos de cáncer [162], por ejemplo, la expresión

de lipoxigenasa 12 se encuentra aumentada significativamente en tumores con un alto grado de malignidad de cáncer de ovario y próstata [163, 164]. Del mismo modo, el aumento de la expresión de la lipoxigenasa 5 en adenomas de colon se correlaciona positivamente con un alta probabilidad de transformación maligna. Interesantemente, la expresión de lipoxigenasa 5, también se reporta en células de cáncer de próstata, y su inhibición previene la proliferación celular y promueve la apoptosis de células de cáncer de próstata [165].

La fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2) se secreta en el torrente sanguíneo principalmente por las células de origen hematopoyético y en circulación se asocia a partículas de LDL [166]. Esta enzima cataliza la hidrólisis de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), generando la liberación de un ácido graso y generando lisofosfolípidos biológicamente activos como la lisofosfatidilcolina y oxidando ácidos no esterificados de los fosfolípidos constituyentes de la LDL [167]. Un meta-análisis a partir de 32 estudios prospectivos demostró una asociación positiva entre la Lp-PLA2 y el riesgo de sufrir enfermedad coronaria y la aterosclerosis. En relación al cáncer un estudio en el cual se analizó la expresión de Lp-PLA2 en 10.000 muestras de tejido humano, se observó que esta fosfolipasa se encuentra sobre-expresada en cáncer colon y próstata [167, 168].

La oxLDL estimula la actividad de la NADPH oxidasa [54], Lp-PLA2 las lipoxigenasas [169-171], esto sugiere por tanto que existe una retroalimentación positiva, donde el aumento de la oxidación de la LDL en el microambiente tumoral es una consecuencia intrínseca del aumento en la expresión y actividad de enzimas modificadoras de LDL inducidas por la oxLDL durante la tumorigénesis.

De esta manera, la oxLDL resultante en estos procesos incrementarían la expresión del receptor LOX-1, el cual media la endocitosis de oxLDL y activa vías de señalización asociadas a angiogénesis, invasión, migración y proliferación.

### **14.3. La oxLDL induce la expresión de marcadores pro-angiogénicos en células humanas de cáncer de próstata.**

La angiogénesis tumoral es una característica distintiva del cáncer identificada como un componente crítico en la progresión del cáncer, capaz de facilitar el crecimiento tumoral y la metástasis. Las células tumorales y células del estroma tumoral secretan factores pro-angiogénicos en respuesta a hipoxia, entre estos se encuentran: el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEFG), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los cuales estimulan a las células endoteliales quiescentes de la vasculatura cercana iniciando la migración y generación de brotes vasculares hacia la masa tumoral [172].

Está demostrado que la oxLDL promueve la vascularización de la de placa aterosclerótica en procesos ateroscleróticos [173], por tanto nosotros proponemos que oxLDL podría inducir la expresión de marcadores de pro-angiogénicos en células humanas de cáncer de próstata, que sobre expresan el receptor LOX-1.

Nuestros resultados demostraron que oxLDL induce un incremento significativo en la expresión de tres importantes marcadores pro-angiogénicos (VEGF, MMP-2 y MMP-9) en forma dependiente de las dosis de oxLDL utilizadas como tratamiento en las tres líneas de células de cáncer de próstata estudiadas.

La oxLDL media la expresión de VEGF en diferentes tipos celulares, en la línea celular murina de macrófagos derivados de leucemia RAW264.7, en

macrófagos murinos peritoneales y en macrófagos humanos derivados de monocitos, a través de una vía que involucra la activación de PI3K y PKC $\zeta$  [174]. De igual manera, en macrófagos humanos derivados de monocitos, la oxLDL incrementa significativamente la expresión del mRNA de VEGF con la subsecuente secreción de esta proteína en una forma dependiente de la concentración de oxLDL (1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y de los tiempos de incubación con esta lipoproteína modificada (6-18 horas). Interesantemente, la regulación de la expresión de VEGF mediada por oxLDL en estos modelos esta mediada por el aumento en la estabilidad de mRNA de VEGF y la activación de vías que involucran la activación de p38 MAPK [175].

El efecto de oxLDL en la expresión de metaloproteinasas de matriz también se ha reportado en modelos celulares de musculatura lisa vascular, macrófagos y células endoteliales. La oxLDL en modelos celulares de musculatura lisa de aorta humana incrementa significativamente la expresión de MMP-2 y MMP-9, a través de un mecanismo epigenético que involucra un incremento en la expresión del microRNA miR-29b, lo que resulta en una disminución de la expresión de la metiltransferasa 3b, que esta encargada de la represión transcripcional de MMP-2 y MMP-9 [175]. Además, en células THP-1 humanas activadas a macrófagos con ésteres de formolmiristato, la oxLDL induce la expresión de MMP-9 en forma dosis (1-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y tiempo dependiente (3-16 horas) a través de la vía de señalización MEK/ERK [176]. La oxLDL también induce la expresión de MMP-2 en células musculares lisas de la vasculatura [177].

En conjunto estos resultados respaldan nuestras observaciones y nos

permiten plantear la posibilidad de que oxLDL, además de inducir la expresión de VEGF, MMP-2 y MMP-9 en células tumorales, podría ejercer efectos similares sobre las células del estroma tumoral, como macrófagos y células endoteliales contribuyendo aún más a la expresión de factores pro-angiogénicos en el microambiente tumoral.

#### **14.4. La expresión de marcadores pro-angiogénicos inducida por la oxLDL depende del receptor LOX-1.**

Como ya se ha mencionado, muchos de los efectos inducidos por oxLDL están mediados por el receptor LOX-1, de esta manera nos planteamos determinar si este receptor es el responsable de mediar la expresión de marcadores pro-angiogénicos inducida por oxLDL en células humanas de cáncer de próstata. Nuestros resultados demostraron que la disminución en la expresión del receptor LOX-1 previene la expresión de VEGF, MMP-2 y MMP-9, inducida por oxLDL, en las tres líneas celulares de cáncer de próstata estudiadas (LNCaP, C4-2 y DU-145). De igual manera, demostramos que la expresión de marcadores pro-angiogénicos mediada por oxLDL y LOX-1 tiene un efecto biológico sobre la estimulación de la angiogénesis tumoral. Nosotros determinamos mediante ensayos funcionales que la oxLDL a través del receptor LOX-1 incrementa significativamente la angiogénesis tumoral de células humanas de cáncer de próstata. Para esto utilizamos dos ensayos funcionales, el análisis de crecimientos de brotes vasculares desde anillos aórticos y la generación de *xenograft* en membranas corioalantoídeas de pollo. Además, determinamos que estos efectos pro-angiogénicos se previenen en las células de cáncer de próstata con una

expresión disminuida del receptor LOX-1, aún en condiciones de tratamiento con oxLDL.

Estudios *in vitro* muestran que en células humanas endoteliales de vena de cordón umbilical tratadas con oxLDL se induce la sobre expresión del receptor LOX-1, generando, además la sobre expresión de moléculas de adhesión, proteínas inflamatorias y proteínas de remodelación de la matriz extracelular, como las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, las cuales están vinculadas a la generación de angiogénesis [119]. Además, bajas concentraciones de oxLDL, inferiores a 5  $\mu\text{g/mL}$  promueven la formación de tubos tipos capilares regulados por LOX-1 y la activación de la vía NADPH oxidasa/MAPK/NF-kappa B, la cual modula positivamente la expresión y secreción de VEGF [120]. Otros experimentos *ex vivo*, muestran que la Angiotensina II un potente factor angiogénico estimula la formación de estructuras tipo capilares de células de cordón umbilical humanas (HUVEC), y este fenómeno se atenúa significativamente por la utilización anticuerpos dirigidos contra en sitio de unión a ligando de LOX-1 [121]. Por otra parte, los estímulos angiogénicos de la angiotensina II sobre la generación de brotes capilares en anillos aórticos murinos son prevenidos al utilizar anillos aórticos de ratones LOX-1 *knockout*, demostrando la importancia de este receptor en la formación de vasos sanguíneos [121]. De igual manera, la delección genética de LOX-1 reduce significativamente la formación de vasos sanguíneos en la neovascularización coroidal inducida por injuria láser en modelos murinos [122].

La hipoxia, el principal inductor de la angiogénesis tanto en la aterogénesis

como en la tumorigénesis, tiene importantes efectos en estimulación de la expresión de LOX-1. Condiciones de hipoxia incrementan la expresión de LOX-1 y bajas concentraciones de oxLDL activan la sub-unidad p47phox de la NADPH oxidasa [123]. Luego, la producción de ROS mediada por NADPH oxidasa activa quinasas que fosforilan la sub-unidad inhibitoria de NF-kB (iKb) permitiendo la translocación al núcleo de NF-kB p65 para promover la transcripción de genes blancos involucrados en la angiogénesis tumoral como VEGF, e incrementar la expresión de genes asociados a proliferación e invasión celular [124]. Todos estos resultados respaldan nuestras observaciones y nos permiten plantear que oxLDL y LOX-1 pueden contribuir de forma complementaria a los procesos canónicos de inducción de la angiogénesis tumoral en cáncer de próstata.

La angiogénesis en cáncer de próstata es un importante indicador de pronóstico, que se correlaciona con el estadio clínico, la progresión, la metástasis y la supervivencia de los pacientes [178]. Además, se ha identificado como un blanco terapéutico en tumores prostáticos resistentes a castración, los cuales presentan un mayor grado de complicaciones clínicas y se asocian con un aumento en la mortalidad en pacientes con cáncer de próstata [179]. Nosotros postulamos que un aumento en la concentraciones de LDL y su subsecuente oxidación en el micro ambiente tumoral potenciaría la angiogénesis tumoral mediada por el receptor LOX-1. Una de las condiciones patológicas que cursa con un aumento en la concentraciones de LDL y las formas oxidadas de estas lipoproteínas es la obesidad [126-128]. En este sentido, la evidencia experimental con modelos animales TRAMP alimentados con dietas hipercalóricas demuestra

que los tumores obtenidos desde animales obesos poseen un mayor grado de vascularización que los tumores procedentes de animales normopeso. Además, los animales obesos presentaron una tasa de crecimiento tumoral significativamente mayor y un mayor número de metástasis con respecto a tumores generados en animales normopeso [180]. Esto nos permite proponer que oxLDL y LOX-1 podrían tener una función en el desarrollo de los procesos de proliferación, invasión y migración de células de cáncer de próstata.

#### **14. 5. La oxLDL y LOX-1 inducen una transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata.**

La presencia de células con capacidad de invasión es un predictor de malignidad en muchos carcinomas como el cáncer de mama y próstata. Este proceso consiste en la migración de células tumorales desde el foco inicial de origen de la neoplasia hacia tejidos colindantes, permitiendo que células tumorales penetren el endotelio vascular y se incorporen a la circulación para formar metástasis en tejidos distantes [87]. Aproximadamente el 80% del total de neoplasias son carcinomas y la ocurrencia de metástasis debida a la progresión del tumor es responsable de la mayoría de las muertes por cáncer [181]. La progresión de la metástasis es un complejo proceso que consta de varios pasos. Estos consideran la invasión local, seguida de la diseminación de células malignas al tejido subyacente, y finalmente el re-establecimiento del tumor en órganos distantes al lugar de origen. Así, la capacidad de las células tumorales para invadir

localmente representa un prerrequisito necesario para el subsecuente desarrollo de metástasis [182].

Para muchos carcinomas el fenómeno de transición epitelio mesenquimal (EMT) favorece los procesos de invasión tumoral [183]. La EMT es un proceso complejo en que células epiteliales pierden muchas de sus características y adquieren características propias de células mesenquimales. Las características de este proceso son la pérdida de polaridad ápico-basal, la ruptura y pérdida de las uniones intercelulares, la secreción de proteasas de matriz y la reorganización del citoesqueleto que genera morfotipos celulares con capacidad migratoria e invasiva [184].

En la presente tesis analizamos la función de la oxLDL y su receptor LOX-1 en la transición epitelio mesenquimal de células de cáncer de próstata. Determinamos que oxLDL induce una disminución significativa en la expresión a nivel de proteína de dos marcadores epiteliales E-cadherina y plakoglobina y un aumento en la expresión del marcador mesenquimal vimentina, en forma concentración dependiente para las tres líneas celulares de cáncer de próstatas utilizadas.

Además, determinamos que los tratamientos con oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 hrs inducen una disminución significativamente en la expresión a nivel mRNA de los marcadores de epiteliales E-Cadherina y plakoglobina y aumenta significativamente la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina, N-cadherina para las tres líneas celulares utilizadas. De igual manera, determinamos que los tratamientos con oxLDL en la línea LNCaP incrementaban

significativamente la expresión de cuatro importantes factores de transcripción asociados a EMT (*snail*, *slug*, *twist* y *zeb1*). Sin embargo, para la línea celular Du-145 solo observamos incrementos significativos en la expresión de *snail* y *slug*, sin observar cambios significativos en la expresión de *twist* y *zeb-1*. Además, para la línea celular C4-2 observamos aumentos significativos en la expresión de *slug* y *zeb-1* sin observar cambios en la expresión de *snail* y *twist*. Estas diferencias de expresión pueden ser atribuidas a la expresión diferencial de estos factores de transcripción en las distintas líneas celulares cáncer de próstata [185, 186]. Además, se ha reportado que la expresión por si sola de *snail* o *slug* pueden promover una EMT en células humanas de cáncer de próstata [187, 188], lo cual podría justificar que a pesar de no observarse aumentos significativo en los cuatro factores de transcripción, los procesos de EMT pueden ser modulados por la expresión de *snail* o *slug* dependiendo de la línea celular de cáncer de próstata.

Interesantemente, al utilizar modelos celulares que presentan un disminución en la expresión de LOX-1 determinamos que los efectos de oxLDL sobre la inducción de la EMT son prevenidos en las tres líneas celulares estudiadas, permitiéndonos sugerir que oxLDL a través de LOX-1 promueve una EMT en células humanas de cáncer de próstata.

La función de la oxLDL y LOX-1 en la EMT ya ha sido reportada en la línea celular de epitelio renal de rata NRK-52E. Se determinó que concentraciones crecientes de oxLDL (50  $\mu\text{g/mL}$  por 24) incrementan la expresión de LOX-1 acompañado del aumento en la expresión del marcador mesenquimal  $\alpha$ -sma y una disminución del marcador epitelial E-cadherina. Sin embargo, la utilización de

algunos bloqueadores químicos no específicos de LOX-1 como carragenina y Polivinil pirrolidona previenen los efectos inducidos por oxLDL. Además, se describe que todos estos mecanismos inducidos por oxLDL y LOX-1 en células NRK-52E dependen de la generación de ROS, ya que la utilización de antioxidantes como la N-acetil cisteína o TROLOX también previenen los efectos de oxLDL [102]. Además, los tratamientos con oxLDL en células musculares lisas vasculares induce la activación de la vía de  $\beta$ -catenina promoviendo la disociación del complejo E-cadherina/ $\beta$ -catenina. La disminución de la expresión de E-cadherina dependiente la metaloproteinasa MT1-MMP y la concomitante translocación de  $\beta$ -catenina/activa al núcleo celular inducen la activación de mecanismos de proliferación celular [189], los cuales serán abordados en los siguientes capítulos de esta tesis.

En cáncer de próstata la obesidad esta asociada con tumores con estadios de *Gleason* avanzados, los cuales se caracterizan por la invasión local y metástasis. El suero de ratones alimentados con dietas hipercalóricas y con evidente alza de peso, generan un incremento en la invasión, migración y la actividad de MMP-9 en células de cáncer de próstata LNCaP. Además, en estas células los tratamientos con suero de animales obesos muestran un incremento significativo en la expresión de vimentina, una disminución en la expresión de E-cadherina y en la localización de  $\beta$ -catenina en membrana, tres eventos característicos de la EMT [101]. De igual manera, sueros de ratones *ob/ob* los cuales presentan obesidad desde la tercera semana de edad bajo condiciones de alimentación con dieta hipercalórica, inducen la expresión de snail y twist dos

factores asociados a EMT. Además, los tratamientos con estos sueros incrementa la actividad de MMP-9 y disminuye la expresión de E-cadherina y el gen supresor de metástasis *kiss1* en células de melanoma humano [190] .

#### **14.6. La oxLDL y LOX-1 inducen la migración e invasión de células humanas de cáncer de próstata.**

Una de las consecuencias de la EMT es el aumento en la migración e invasión de las células tumorales. Nosotros analizamos los efectos de la oxLDL y su LOX-1 en la trans migración e invasión de células humanas de cáncer de próstata. Utilizando el ensayo de trans migración en *transwells* determinamos que el tratamiento con oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) promueve de forma significativa la trans migración de células de cáncer de próstata. Además, determinamos mediante el ensayo de curación de la herida que la oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) promueve significativamente la invasión en dos dimensiones de las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y DU-145. Interesantemente, estos dos fenómenos promovidos por oxLDL, son prevenidos al utilizar un modelo celular con la expresión disminuida de LOX-1, permitiéndonos sugerir que oxLDL a través de su receptor LOX-1 podría inducir la migración e invasión en células humanas de cáncer de próstata.

La oxLDL en células mesenquimales derivadas de medula ósea estimula la trans migración celular y sus interacciones celulares con monocitos en una forma dosis y tiempo dependiente. Los niveles de expresión de ICAM, PECAM-1 y

VCAM-1, MCP-1, LOX-1 y TGF- $\beta$ , así como, los niveles intracelulares de calcio también aumentan de forma significativa en los tratamientos con oxLDL en forma dosis dependiente. Sin embargo, la utilización de un anticuerpo de bloqueo contra el receptor LOX-1 previene la migración y adhesión de células mesenquimales derivadas de medula ósea [191]. De igual manera, la oxLDL contribuye al reordenamiento del citoesqueleto y a la migración de macrófagos, favoreciendo al atrapamiento de los macrófagos en la íntima arterial promoviendo, por tanto, la progresión de la aterosclerosis [192]. También, la oxLDL promueve la proliferación y migración de células musculares lisas humanas derivadas de la vasculatura a través de la activación de osteoponina, la que promueve la expresión a nivel de mRNA y proteína de la MMP-9, favoreciendo procesos de invasión celular [193].

En cáncer los efectos de oxLDL en la migración e invasión celular ya han sido descritos, durante la realización de esta tesis el año 2015, el grupo de Ye D. y colaboradores describen que oxLDL estimula la migración e invasión de células LNCaP y PC-3 en forma dependiente de la concentración de oxLDL utilizadas (4-100 ug/ml) [78]. Sin embargo, los autores no describen de forma clara que estos fenómenos sean mediados por el receptor LOX-1. Además, *Hirsh* y colaboradores describen que la utilización de un siRNA contra LOX-1 reduce significativamente la migración e invasión de células de epitelio mamario MCF-10A transformadas con el oncogén *scr* [30]. De igual manera, se ha reportado que la sobre expresión de LOX-1 en células ductales mamarias HCC1143 incrementa de forma significativa la invasión celular [62]. Interesantemente, LOX-1 también se ha descrito como una molécula de adhesión celular: un estudio realizado en año 2007 demostró que la

sobre expresión de LOX-1 en células endoteliales inducida por TNF- $\alpha$  facilita la adhesión y migración trans-endotelial de células de cáncer de mama MDA-MD-231, proponiendo que LOX-1 podría tener importantes funciones en la metástasis del cáncer mama [103].

#### **14.7. La oxLDL y LOX-1 aumenta la actividad de las MMPs de matriz 2 y 9 en células humanas de cáncer de próstata.**

En procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos la invasión celular va acompañada de la secreción de proteasas que facilitan la migración celular a través de la matriz extracelular[194]. Una de las familias de proteasas que ha sido ampliamente estudiadas en cáncer es la familia de las metaloproteinasas de matriz. Esta familia esta constituida por 24 miembros y han sido descritas como los principales MMP mediadoras en las alteraciones observadas en el microambiente tumoral durante la progresión del cáncer [195]. Las MMP contribuyen fundamentalmente en la degradación del tejido conectivo y los componentes de la membrana basal, además de activar factores de crecimiento, receptores de superficie para moléculas de adhesión y quimioquinas en microambiente tumoral [196]. Una característica de los tumores malignos es su capacidad de invadir tejidos y generar metástasis, en este proceso las enzimas proteolíticas como las MMPs son componentes relevantes por su capacidad de degradar las proteínas de la ECM. Así, la secreción de metaloproteinasas por las células tumorales y del estroma tumoral, y la concomitante activación de estas enzimas, permiten la degradación de las estructuras tisulares, proporcionando el acceso al sistema vascular y linfático del tumor, facilitado su diseminación [197].

En este estudio analizamos la expresión y activación de dos importantes metaloproteinasas con actividad colagenasa IV: la MMP-2 y MMP-9, las cuales han sido asociadas con procesos de angiogénesis, invasión y metástasis tumoral.

Como mencionamos anteriormente, los estímulos de oxLDL inducen la expresión de MMP-2 y MMP-9 en forma dependientes de las concentraciones de oxLDL utilizadas para las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y DU-145. Además, determinamos que este proceso es mediado por la activación del receptor LOX-1. Al demostrar que oxLDL induce la migración e invasión de células de cáncer de próstata, nos preguntamos si oxLDL a través de LOX-1 induce la activación de las metaloproteinasas 2 y 9. Utilizando ensayos de zimografía en geles de poliagrilamida al 0,1% de gelatina determinamos que la oxLDL promueve la actividad gelatinasa de las dos MMP en forma dependiente de las dosis de oxLDL utilizadas, para las tres líneas celulares de cáncer de próstata estudiadas. Además, utilizando un modelo celular de cáncer de próstata con la expresión disminuida de LOX-1, determinamos que los efectos de oxLDL sobre la activación de las MMPs de matriz 2 y 9 son prevenidos en esta línea celular. Estos resultados nos permiten postular que los efectos observados en la inducción de la actividad de metaloproteinasas 2 y 9 es dependiente de la activación de LOX-1 por oxLDL en líneas celulares humanas de cáncer de próstata.

Como ya se ha descrito, la expresión de las metaloproteinasas de matriz inducida por oxLDL a través de LOX-1 se ha reportado para otros tipos celulares no cancerígenos asociados a la progresión de la aterosclerosis. De igual manera el aumento en la actividad de estas metaloproteinasas mediada por oxLDL también ha

sido reportada previamente para modelos celulares no cancerígenos, como células musculares lisas vasculares y macrófagos [177, 198-200]. Estos antecedentes respaldan nuestras observaciones sobre la función de LOX-1 y oxLDL en los procesos de invasión tumoral.

#### **14.8. La oxLDL y LOX-1 inducen una reestructuración del citoesqueleto de actina en células humanas de cáncer de próstata.**

Una de las consecuencias intrínsecas de los procesos de migración e invasión celular durante la EMT [201], es la reestructuración del citoesqueleto de actina. El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina que tiene como función la mantención de la arquitectura celular, además de facilitar los procesos de motilidad celular [202]. Normalmente las células epiteliales presentan una organización cortical de los filamentos de actina. Sin embargo, durante los procesos de transición epitelio mesenquimal las células reestructuran el citoesqueleto de actina disminuyendo la distribución de actina cortical y aumentando la generación de estructuras como filopodios y lamelipodios los cuales facilitan la migración celular [201].

De esta manera, a partir de las observaciones realizadas en la presente tesis en la cual determinamos que oxLDL es capaz de inducir una EMT acompañada de la migración e invasión celular nos propusimos determinar mediante inmunocitoquímica si oxLDL y LOX-1 inducen una reestructuración del citoesqueleto de actina en células humanas de cáncer de próstata durante la inducción de la EMT. Nuestros resultados muestran que oxLDL induce cambios severos en la distribución de filamentos de actina acompañado de una disminución

aparente en la inmunoreactividad de E-cadherina y aumento en la inmunoreactividad de vimentina. Determinamos, que la localización cortical y las interacciones célula-célula disminuyen cuando las células son tratadas con oxLDL (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 48 horas. De igual manera determinamos que oxLDL promueve la generación de filopodios y lamelipodios en todas las células de cáncer de próstata utilizadas. Sin embargo, al utilizar una línea celular de cáncer de próstata con la expresión disminuida del receptor LOX-1 los efectos de oxLDL en la reestructuración del citoesqueleto de actina son prevenidos. Estos resultados nos permiten postular que existe una reestructuración del citoesqueleto de actina en los procesos en la EMT inducida por oxLDL y LOX-1.

La activación de LOX-1 por oxLDL en cultivos de células endoteliales de aorta humana inducen una rápida activación de Rho y Rac1, así como, un aumento en la actividad de la metaloproteinasa MT1-MMP promoviendo la migración e invasión celular [43]. La sobre-expresión de LOX-1 en fibroblastos humanos senescentes resulta en reestructuración del citoesqueleto promoviendo la generación de fibras de estrés y restauración parcial de la expresión de proteínas relacionadas a este proceso como Cdc42 y la quinasa p70 S6. Además, la sobre expresión de LOX-1 aumenta significativamente el potencial replicativo de fibroblastos humanos senescentes y restaura la expresión de genes relacionados a proliferación como el oncogén *mdm2*[203]. Es importante destacar que la sobre expresión del gen *mdm2* en fibroblastos humanos conduce a la formación de tumores en ratones *nu/nu* [204], sugiriendo que oxLDL y LOX-1 podrían mediar señales pro-oncogénicas que facilitan el crecimiento tumoral.

Además, el intercambiador de nucleótidos de guanina 1 (ARHGEF1, *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 1*) y la proteína kinasa 2 asociada a Rho (ROCK2, *Rho-associated protein kinase 2*), dos moléculas relacionadas a la activación de Rho, durante los procesos de motilidad celular y reestructuración del citoesqueleto han sido asociadas con LOX-1 a través de ensayos de inmunoprecipitación [205]. De igual manera se describe que la activación de LOX-1 por oxLDL induce la activación de ROCK2, y que estos efectos son prevenidos por la utilización de un siRNA contra LOX-1 [205].

Las GTPasas pequeñas Rho, Rac1 y Cdc42 son importantes moduladores de la reorganización del citoesqueleto de actina [93] y ejercen su función mediante la reestructuración de las adhesiones intercelulares (complejos de adhesión focal) y el regulación de la motilidad celular [87]. Así, durante la invasión tumoral y metástasis la activación de las GTPasas Rho, Rac1 y Cdc42 jugarían un rol fundamental en la migración durante la EMT ya que este fenómeno es esencial para la generación de morfotipos móviles e invasivos [206].

Estudios paralelos a esta tesis, realizados en nuestro laboratorio determinaron mediante estudios de *GST pull down* que los tratamientos oxLDL en células DU-145 activan a Rho y Rac-1, permitiéndonos postular que la reestructuración del citoesqueleto observada durante el proceso de EMT inducido por oxLDL y LOX-1 en células de cáncer de próstata seria mediado por una activación de Rho y Rac1 [207].

Como ya hemos mencionado la obesidad es un importante factor de riesgo para el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Además, estudios epidemiológicos y experimentales demuestran que pacientes obesos con cáncer

de próstata presentan mayor número de metástasis y una progresión mas rápida que pacientes con cáncer de próstata normopeso [53]. En la obesidad las concentraciones séricas de LDL y oxLDL se encuentran significativamente aumentas [30-32] y el microambiente tumoral en cáncer favorece la oxidación de LDL [208].

Nuestros resultados indican que oxLDL y LOX-1 promueven la EMT, la migración, la invasión celular y la reestructuración del citoesqueleto en células de cáncer de próstata. De esta manera, nuestros resultados nos permiten sugerir que la oxLDL a través de LOX-1 el cual se encuentra sobre expresado en cáncer de próstata, induce procesos de invasión tumoral en pacientes obesos con cáncer de próstata, permitiéndonos explicar en parte el hecho que pacientes obesos con cáncer de próstata progresan en un menor tiempo hacia la metástasis.

#### **14.9. La oxLDL y LOX-1 induce un aumento de proliferación celular en células de cáncer de próstata.**

Una neoplasia es una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede y está descoordinado con el de los tejidos normales, y persiste de la misma forma excesiva después de cesar los estímulos que desencadenaron el cambio. En este sentido un tema fundamental en la biología tumoral es entender los factores que afectan las velocidades de crecimiento de los tumores y su influencia en el pronóstico clínico y las respuestas terapéuticas. Normalmente la velocidades de crecimiento tumoral depende de tres factores La velocidad de crecimiento de un tumor se determina por tres factores principales: el tiempo de duplicación de las células tumorales, la fracción de células tumorales que están en el fondo común

replicativo y la velocidad a la que se eliminan o mueren las células [181].

Es esta tesis nos planteamos analizar el efecto de oxLDL y LOX-1 en la proliferación de celular *in vitro* de células de cáncer de próstata. Determinamos, mediante ensayos de proliferación celular con MTT que las tres líneas de cáncer de próstata (LNCaP, C4-2 y DU-145) tratadas con concentraciones crecientes de oxLDL (5,10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) incrementan significativamente la tasa de proliferación celular en forma dependientes de concentraciones utilizadas. Además, observamos un mayor efecto en el incremento de las tasas de proliferación para la línea celular DU-145 , seguida de la línea celular C4-2 y por ultimo la línea celular LNCaP. Determinamos que al utilizar una línea celular que presenta disminuida la expresión de LOX-1 los efectos de oxLDL sobre la inducción de la proliferación celular son prevenidos, sugiriendo que oxLDL y LOX-1 contribuyen de forma positiva en la promoción de la proliferación celular en cáncer de próstata. Sin embargo, no es posible concluir con estos ensayos si el efecto de oxLDL y LOX-1 regula las velocidades de crecimiento o aumenta la fracción del fondo común proliferativo por lo cual se hace necesario realizar una mayor cantidad de experimentos como citometría de flujo del ciclo celular y cinéticas de crecimiento celular para determinar claramente cuales son los mecanismos por los cuales oxLDL y LOX-1 incrementan la proliferación celular en células de cáncer de próstata.

Los efectos mitogénicos oxLDL han sido reportados en células musculares lisas vasculares humanas, en las cuales oxLDL activa la vía de señalización Ras/Raf/MEK/MAPK, promoviendo la proliferación celular [209].

Bajas concentraciones de oxLDL inducen la proliferación celular de células humanas de cordón umbilical mediante un efecto dual sobre la progresión del ciclo celular. Primero, promoviendo la disminución del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina B1 (p27<sup>Kip1</sup>) en forma dosis dependiente de las concentraciones de oxLDL utilizadas (5-50 µg/mL) y segundo, induciendo la activación de RhoA una proteína importante en la progresión del ciclo celular en fase G1, principalmente a través de la regulación de la ciclina D1 y la modulación de la expresión de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (p21 y p27) [210]. De igual manera, los efectos de oxLDL en la proliferación celular también han sido demostrados sobre fibroblastos humanos senescentes y células musculares lisas vasculares de conejo. Tratamientos con concentraciones crecientes de oxLDL (0, 10 y 50 µg/mL) por 24 y 48 hrs incrementan significativamente el número de células para los dos tipos celulares. Además, el incremento en la proliferación celular fue asociado con un incremento significativo en la expresión de proteínas que regulan la entrada al ciclo celular como cdc2 (*cell division cycle 2*), cdk2 (*cyclin-dependent kinase 2*), cdk4 (*cyclin-dependent kinase 4*), ciclina B1, ciclina D1 y PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) [211].

Los efectos oxLDL también han sido estudiados sobre células musculares lisas vasculares de ratón. En estas células oxLDL induce la activación de la

vía ERK 1/2 aumentando la proliferación celular lo que se evidenció por un aumento en la expresión de ki67. Interesantemente, la utilización de simvastatina una estatina que previene la expresión de LOX-1 o un siRNA contra LOX-1 previenen la activación de ERK 1/2 y los efectos proliferativos inducidos por oxLDL [212]. De igual manera, los tratamientos con concentraciones crecientes de oxLDL (1-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en células de epitelio ductal mamario (MCF10A) incrementa de forma significativa las tasas de proliferación en forma dosis dependiente [63]. Además, se ha demostrado que la utilización de un siRNA contra el receptor LOX-1 en células de cáncer MCF10A transformadas con el oncogén scr disminuyen significativamente las tasas de crecimiento celular. De igual manera, se ha descrito que la utilización de un siRNA contra LOX-1 disminuye significativamente el crecimiento celular en las líneas tumorales de cáncer de mama MCF-7, de cáncer cérvico uterino Hela y cáncer hepático HepG2. Sin embargo, la utilización de un siRNA contra LOX-1 en células no tumorales como la línea de células ductales mamarias MCF10A, la línea de células epiteliales de glándula mamaria HME1 y en la línea de células epiteliales prostáticas PWR-1E, no genera cambios en las tasas de crecimiento celular, sugiriendo que LOX-1 tiene un importante rol en la inducción de la proliferación celular en cáncer [30].

Además, un estudio posterior a nuestra primera publicación, en la cual describimos por primera vez que LOX-1 y su activación por oxLDL inducen un aumento en la angiogénesis y la proliferación de células de cáncer próstata, describe que oxLDL incrementa la proliferación de células de cáncer de próstata LNCaP y PC3 en forma dosis dependiente (1-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )[78].

#### **14.10. La oxLDL y el receptor LOX-1 incrementan el potencial tumorigénico de células de cáncer de próstata.**

A partir de los resultados obtenidos de los análisis de proliferación celular, nos planteamos determinar la función de oxLDL y LOX-1 en potencial tumorigénico de células de cáncer de próstata *in vitro*. Utilizando el ensayo de agar suave determinamos que la oxLDL (100µg/mL) incrementa significativamente el número de colonias de células de cáncer de próstata respecto de las células no tratadas con oxLDL. Además, determinamos que la utilización de una línea celular de cáncer de próstata que presenta una expresión disminuida de LOX-1, previene los efectos inducidos por oxLDL. También observamos que la línea celular que presenta disminuida la expresión de LOX-1 mediante la expresión estable de un shRNA contra el receptor genera un menor número de colonias respecto a la línea celular que expresa un shRNA control. Estos resultados nos permiten sugerir que oxLDL incrementa el potencial tumorigénico de células de cáncer de próstata mediante la activación de LOX-1, además nuestros resultados nos permiten plantear que LOX-1 por si solo podría ser determinante en la tumorigénesis de células de cáncer de próstata.

Apoyando nuestros resultados existe evidencia que la oxLDL podría jugar un importante rol en carcinogénesis y tumorigenicidad de varios tipos de cáncer [143, 213-216]. Por ejemplo, pacientes con cáncer de mama, ovario y cáncer colorectal poseen altos niveles de oxLDL, anticuerpos anti-oxLDL y un alta tasa de formación de dienos conjugados comparados parados con individuos sanos [217], sugiriendo que la oxLDL podría tener importantes funciones en la carcinogénesis

y la progresión de estos tipos de cáncer a estadios clínico patológicos avanzados. Altos niveles de oxLDL también se han encontrado en pacientes con cáncer de próstata avanzado. Además, se ha descrito que oxLDL promueve la activación de vías de señalización relacionadas con el incremento del potencial tumorigénico como son las vías asociadas a  $\beta$ -catenina, cMyc, NF- $\kappa$ B, STAT1 y STAT3 en células de cáncer de próstata PC3 [78].

Además, la oxLDL es capaz de desencadenar una serie de señales pro-oncogénicas en células epiteliales mamarias MCF-10A a través de la estimulación del microRNA MIR-21. La activación de LOX-1 por oxLDL en la línea MCF10A promueve un aumento en la proliferación celular, junto con el aumento en la expresión de las lipoxigenasas 12 y 15, las sub de la NADPH oxidasa p22<sup>phox</sup> y p27<sup>phox</sup>. De igual manera, oxLDL induce la activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B mediante la inducción de la fosforilación de la sub unidad inhibitoria de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), la fosforilación y translocación nuclear de la sub unidad p65 de NF- $\kappa$ B. Además, también se induce la activación de p44/p42 MAPK, PI3K y Akt junto con un aumento de la expresión del microRNA pro-oncogénico hsa-miR-21 y una disminución en la expresión del supresor tumoral PTEN, un gen blanco de la acción de miR-21 y un modulador de la vía PI3K/Akt . La utilización de inhibidores del hsa-miR-21 previene la activación de la vía PI3K/Akt inducida por oxLDL [63], lo cual sugiere que oxLDL podría iniciar importantes eventos tumorigénicos a través de la activación de vías de señalización pro-oncogénicas y la inhibición de mecanismos de supresión tumoral.

Además, tratamientos con siRNAs contra el receptor LOX-1 en células

tumorales Hela, HepG2, MCF-7 y la línea MCF10A disminuye significativamente la capacidad de formar colonias en ensayos de agar suave, demostrando que LOX-1 posee un importante rol en la tumorigenicidad y la mantención de la transformación celular en cáncer [30].

Así, los resultados reportados en literatura en conjunto con nuestras observación nos permiten proponer que la activación de LOX-1 por oxLDL potenciaría la tumorigenicidad de células de cáncer de próstata como respuesta a una sobre activación de vías pro-oncogénicas y una inhibición de genes involucrados en la supresión tumoral. Además, proponemos que LOX-1 por si solo, podría tener un importante rol en crecimiento tumoral ya que las líneas celulares que expresan un shRNA contra LOX-1 disminuyen significativamente su capacidad de crecimiento en soportes semisólidos de agar suave.

#### **14.11. El receptor LOX-1 es determinante para el crecimiento de *xenograft* subcutáneos de células humanas de cáncer de próstata C4-2.**

Para determinar el rol de LOX-1 en el crecimiento tumoral utilizamos la línea celular estable C4-2/shRNA-LOX-1, la cual presenta una disminución significativa de la expresión del receptor LOX-1. Generamos xenografts subcutáneos de esta línea celular en ratones *nude* y determinamos que existe una disminución significativa en el tamaño y peso tumoral en los xenografts de células C4-2/shRNA-LOX-1, incluso observamos que dos animales no presentaron crecimiento de esta línea celular, comparado con el crecimiento tumoral de una línea celular C4-2shRNA control que fue inoculada en el mismo animal.

Hirsh y colaboradores en el año 2010 describen por primera vez la sobreexpresión del mRNA de LOX-1 en carcinomas mamarios y prostáticos de estadios clínico patológicos avanzados. Además, demostraron a través del análisis de perfiles transcripcionales de células epiteliales mamarias transformadas con los oncogenes src o ras/telomerasa y la comparación de perfiles transcripcionales de enfermedades del metabolismo lipídico que existen perfiles transcripcionales comunes entre los procesos carcinogénicos y los trastornos del metabolismo lipídico, evidenciando la importancia del metabolismo lipídico en los procesos de transformación celular en cáncer. Específicamente se identificaron 24 nodos centrales comunes, incluyendo nodos asociados a inflamación entre los cuales destacan INF- $\gamma$ , IL-1b, IL6, y NF-Kb sugiriendo además que los procesos inflamatorios son importantes tanto en cáncer como enfermedades del metabolismo lipídico. La insulina y el colesterol LDL también se reportaron como nodos centrales en la expresión genética relacionada al cáncer, sugiriendo la importancia de estas dos moléculas en la carcinogénesis. En este sentido se reportó que la utilización de un siRNA contra LOX-1 previene el crecimiento tumoral de xenografts de epiteliales mamarias MCF10A transformadas con el oncogén scr, demostrando que LOX-1 es esencial para la mantención de la transformación y el crecimiento tumoral de células en cáncer de mama [30].

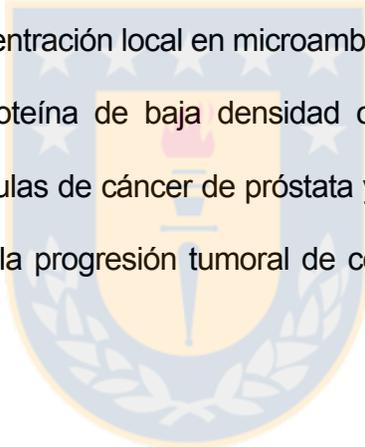
Por tanto, los resultados obtenidos por Hirsh y colaboradores en conjunto con nuestras observaciones nos permiten plantear que LOX-1 podría ser un importante componente en la modulación del crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata. Sin embargo, no podemos descartar que la ausencia de LOX-1 pueda afectar mecanismos de adaptación y anidamiento en un contexto *in vivo*

de las células de cáncer de próstata, ya que nuestro modelo presenta una disminución estable de la expresión de LOX-1, lo cual no nos permite determinar si los eventos que desencadenan un menor crecimiento tumoral están relacionados a eventos iniciales de colonización de nuestro modelo celular o a una disminución en la cinética de crecimiento tumoral. Esto podría ser resuelto de dos maneras, mediante la generación de líneas celulares cáncer de próstata que presenten un vector de expresión de shRNAs inducible o el tratamiento con siRNA encapsulados en partículas liposomales una vez formado el tumor. De esta manera, se podría determinar si LOX-1 es importante en el crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata. De igual manera se podría determinar si LOX-1 es importante en los mecanismos de anidamiento y colonización realizando ensayos de metástasis experimentales con la línea celular que expresa establemente un shRNA contra el receptor LOX-1 y determinar el número de metástasis generadas en órganos como el pulmón e hígado en comparación a una línea que exprese un shRNA/control.

En conjunto nuestros resultados muestran que el receptor LOX-1 se encuentra sobre-expresado en líneas células de cáncer de próstata, en adenocarcinomas prostáticos humanos y en tejido metastásico de pacientes con cáncer de próstata. Además, los resultados muestran que la activación de LOX-1 por su ligando la oxLDL en células humanas de cáncer de próstata promueve la angiogénesis, la invasión, la proliferación y crecimiento tumoral, procesos que se encuentran estrechamente asociadas a la progresión tumoral de este tipo de cáncer. De esta manera, nosotros proponemos que la estimulación de la progresión tumoral mediada por LOX-1 y oxLDL podrían dar repuesta en parte al hecho que, pacientes obesos con cáncer de próstata

presentan una progresión tumoral acelera y una mayor probabilidad de desarrollo de metástasis en comparación a pacientes normopeso con cáncer de próstata. Esta propuesta estaría apoyada por nuestros resultados y por la evidencia que reporta que:

1. Pacientes obesos presenta altas concentraciones séricas de LDL y la forma oxidada de esta lipoproteína.
2. En el microambiente tumoral se encuentra aumentada la expresión y actividad de enzimas modificadoras de LDL las cuales promueven su oxidación e incrementarían su concentración local en microambiente tumoral.
3. El receptor para lipoproteína de baja densidad oxidada, LOX-1 se encuentra sobre expresado en células de cáncer de próstata y que su activación por oxLDL induce un aumento de la progresión tumoral de células humanas de cáncer de próstata.



## 15.-CONCLUSIÓN

En esta tesis demostramos que el receptor LOX-1 está sobreexpresado en células humanas de cáncer de próstata, y su activación por la oxLDL induce procesos asociados a la progresión tumoral, como la angiogénesis, la invasión y el crecimiento tumoral.

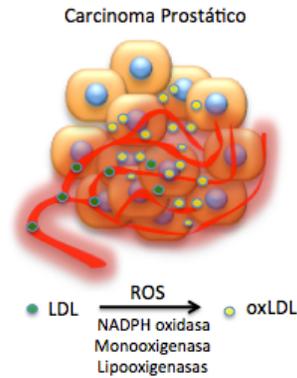
Por tanto, proponemos que los efectos generados por LOX-1 y la oxLDL en células humanas de cáncer de próstata podrían justificar a nivel molecular los datos epidemiológicos que correlacionan aspectos clínicos de la obesidad y el cáncer de próstata, donde pacientes obesos presentan una progresión tumoral acelerada y una mayor probabilidad de desarrollo de metástasis en comparación con pacientes normopeso.



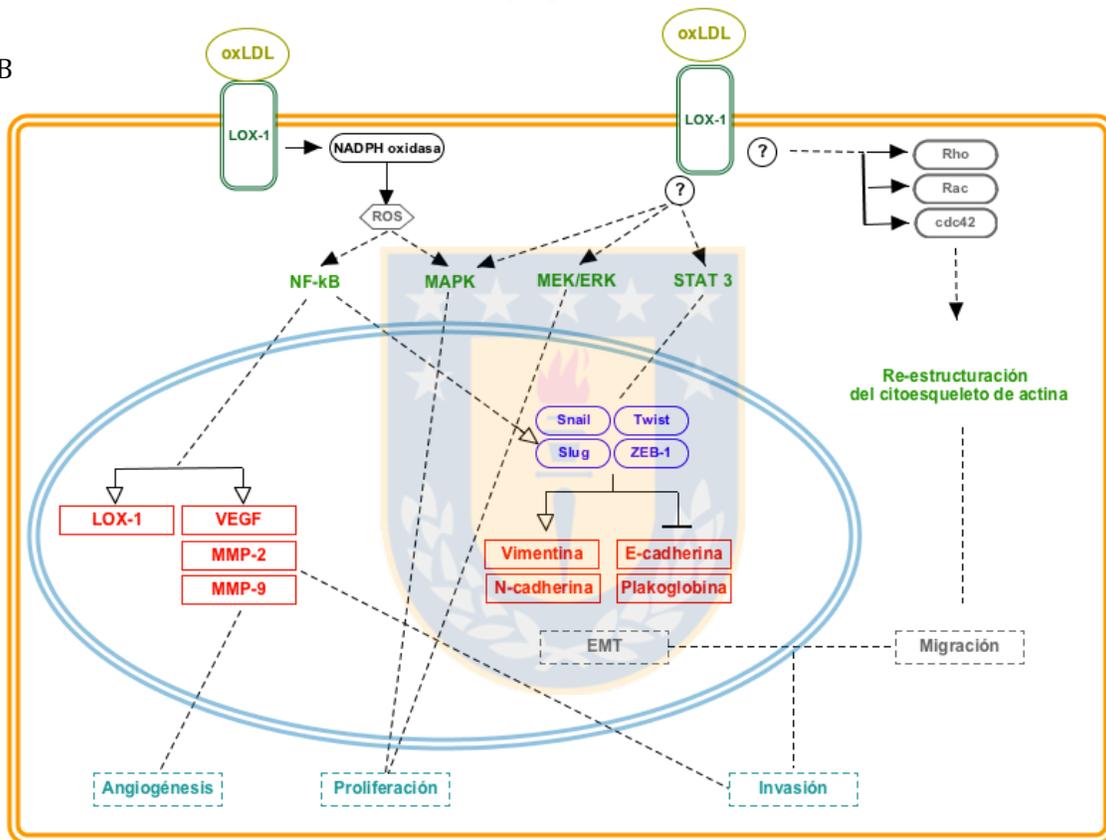
## 16.-MODELO Y MECANISMO PROPUESTO

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis y la información reportada en bibliografía proponemos que: 1) Las altas concentraciones de LDL circulante presentes en pacientes obesos con cáncer de próstata y el aumento en la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos asociados al tumor, posibilitan el ingreso de la LDL al microambiente tumoral. 2) En el microambiente tumoral las altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno y el aumento en la actividad de enzimas modificadoras de la LDL como la NADPH oxidasa, las lipooxigenasas, la mieloperoxidasa y la fosfolipasa A2 promoverían su oxidación e incrementarían la concentración local la oxLDL en el microambiente tumoral (figura 49A) . 3) El receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada, LOX-1 está sobreexpresado en células humanas de cáncer de próstata y su activación por la oxLDL induciría, por mecanismos aun no descritos la activación de vías de transducción de señales tales como NF- $\kappa$ B, MAPK, STAT3 y MEK/ERK, las cuales inducirían la expresión de factores pro-angiogénicos (VEGF, MMP-2 y MMP-9), la expresión de factores de transcripción asociados a EMT (*snail*, *slug*, *twist* y *zeb1*), los cuales a su vez mediarían la represión transcripcional de marcadores epiteliales como E-cadherina y plakoglobina además de inducir la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina y N-cadherina. Además, proponemos que la activación de LOX-1 por oxLDL induciría la activación de las GTPasas pequeñas Rho, Rac y cdc42 las cuales modulan las dinámicas del citoesqueleto en procesos de migración celular. Por lo tanto, la activación de LOX-1 por oxLDL en células humanas de cáncer de próstata promovería la angiogénesis, invasión, proliferación y crecimiento tumoral (figura 49B).

A



B



**Figura 49. Modelo y mecanismos propuestos de la función de la oxLDL y LOX-1 en células humanas de cáncer de próstata.**

A) La LDL circulante ingresa al microambiente tumoral favorecida por el aumento en la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos asociados al tumor y es oxidada por las especies reactivas del oxígeno y las enzimas modificadoras de LDL presentes en el microambiente tumoral. B) El receptor LOX-1 está sobreexpresado en células humanas de cáncer de próstata y activa vías de señalización que promueven la angiogénesis, migración, invasión, proliferación y crecimiento tumoral. Las flechas negras indican activación, las flechas blancas indican inducción de la expresión, las líneas perpendiculares indican represión de la expresión y las líneas discontinuas representan los efectos funcionales de la activación de vía.

## 17.-BIBLIOGRAFÍA

1. Hoover-Plow, J. and M. Huang, *Lipoprotein(a) metabolism: Potential sites for therapeutic targets*. Metabolism, 2012.
2. Kronenberg, F., et al., *Lipoprotein(a) in health and disease*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1996. **33**(6): p. 495-543.
3. Austin, M.A., J.E. Hokanson, and J.D. Brunzell, *Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance*. Curr Opin Lipidol, 1994. **5**(6): p. 395-403.
4. Trostchansky, A. and H. Rubbo, *Lipid nitration and formation of lipid-protein adducts: biological insights*. Amino Acids, 2007. **32**(4): p. 517-22.
5. Steinberg, D., *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 20963-6.
6. Veniant, M.M., et al., *Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice*. J Clin Invest, 1998. **102**(8): p. 1559-68.
7. Chu, Y.F. and R.H. Liu, *Novel low-density lipoprotein (LDL) oxidation model: antioxidant capacity for the inhibition of LDL oxidation*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(22): p. 6818-23.
8. Retsky, K.L., M.W. Freeman, and B. Frei, *Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti-rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions*. J Biol Chem, 1993. **268**(2): p. 1304-9.
9. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
10. Sinatra, S.T. and J. DeMarco, *Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart: antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage*. Conn Med, 1995. **59**(10): p. 579-88.
11. Cosgrove, J.P., D.F. Church, and W.A. Pryor, *The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids*. Lipids, 1987. **22**(5): p. 299-304.
12. Koschinsky, M.L. and S.M. Marcovina, *Lipoprotein(a): structural implications for pathophysiology*. Int J Clin Lab Res, 1997. **27**(1): p. 14-23.
13. Murphy, J.E., et al., *Oxidised LDL internalisation by the LOX-1 scavenger receptor is dependent on a novel cytoplasmic motif and is regulated by dynamin-2*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 13): p. 2136-47.
14. Yamada, Y., et al., *Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(7): p. 628-40.
15. Sawamura, T., et al., *An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein*. Nature, 1997. **386**(6620): p. 73-7.

16. Drickamer, K. and R.B. Dodd, *C-Type lectin-like domains in Caenorhabditis elegans: predictions from the complete genome sequence*. Glycobiology, 1999. **9**(12): p. 1357-69.
17. Yamanaka, S., et al., *The human gene encoding the lectin-type oxidized LDL receptor (OLR1) is a novel member of the natural killer gene complex with a unique expression profile*. Genomics, 1998. **54**(2): p. 191-9.
18. Oka, K., et al., *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9535-40.
19. Moriwaki, H., et al., *Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(10): p. 1541-7.
20. Chen, M., T. Masaki, and T. Sawamura, *LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis*. Pharmacol Ther, 2002. **95**(1): p. 89-100.
21. Chen, M., et al., *Conserved C-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized low-density-lipoprotein binding*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 2): p. 289-96.
22. Kataoka, H., et al., *Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6573-9.
23. Ohki, I., et al., *Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL*. Structure, 2005. **13**(6): p. 905-17.
24. Shi, X., et al., *Characterization of residues and sequences of the carbohydrate recognition domain required for cell surface localization and ligand binding of human lectin-like oxidized LDL receptor*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 7): p. 1273-82.
25. Xie, Q., et al., *Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells*. DNA Cell Biol, 2004. **23**(2): p. 111-7.
26. Matsunaga, S., et al., *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) functions as an oligomer and oligomerization is dependent on receptor density*. Exp Cell Res, 2007. **313**(6): p. 1203-14.
27. Chen, M. and T. Sawamura, *Essential role of cytoplasmic sequences for cell-surface sorting of the lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(3): p. 553-61.
28. Chen, X.P. and G.H. Du, *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: protein, ligands, expression and pathophysiological significance*. Chin Med J (Engl), 2007. **120**(5): p. 421-6.
29. Yoshimoto, R., et al., *The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance*. Cardiovasc Drugs Ther, 2011. **25**(5): p. 379-91.
30. Hirsch, H.A., et al., *A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases*. Cancer Cell, 2010. **17**(4): p. 348-61.

31. Chen, X.P., T.T. Zhang, and G.H. Du, *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, a new promising target for the therapy of atherosclerosis?* Cardiovasc Drug Rev, 2007. **25**(2): p. 146-61.
32. Cilingiroglu, M. and K. Ozer, *The lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor and its role in atherosclerosis.* Curr Atheroscler Rep, 2005. **7**(2): p. 103-7.
33. Aviram, M. and B. Fuhrman, *LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: role of prooxidants vs. antioxidants.* Mol Cell Biochem, 1998. **188**(1-2): p. 149-59.
34. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead.* Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
35. Kume, N., [*Molecular mechanisms of coronary atherosclerotic plaque formation and rupture*]. Nihon Rinsho, 2010. **68**(4): p. 637-41.
36. Kume, N., et al., *Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells.* Circ Res, 1998. **83**(3): p. 322-7.
37. Kume, N., et al., *Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 323-7.
38. Aoyama, T., et al., *Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells.* J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(12): p. 2101-14.
39. Aoyama, T., et al., *LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells.* FEBS Lett, 2000. **467**(2-3): p. 217-20.
40. Hu, C., et al., *Regulation of TGFbeta1-mediated collagen formation by LOX-1: studies based on forced overexpression of TGFbeta1 in wild-type and lox-1 knock-out mouse cardiac fibroblasts.* J Biol Chem, 2008. **283**(16): p. 10226-31.
41. Taye, A. and A.A. El-Sheikh, *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 pathways.* Eur J Clin Invest, 2013. **43**(7): p. 740-5.
42. Li, D., et al., *LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury: modulation of MMP-1 and inflammation.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H1795-801.
43. Sugimoto, K., et al., *LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells.* Cardiovasc Res, 2009. **84**(1): p. 127-36.
44. Bray, F., et al., *Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study.* Lancet Oncol, 2012. **13**(8): p. 790-801.
45. Bray, F. and B. Moller, *Predicting the future burden of cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 63-74.
46. Hsu, I.R., et al., *Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and cancer.* Am J Clin Nutr, 2007. **86**(3): p. s867-71.
47. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.* N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
48. Brinkman, M., et al., *Are men with low selenium levels at increased risk of prostate cancer?* Eur J Cancer, 2006. **42**(15): p. 2463-71.

49. Salud, M.d., *Guía Clínica, Cáncer de Próstata en personas de 15 años y mas*. 2010.
50. Chan, J.M., et al., *What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology*. *Semin Cancer Biol*, 1998. **8**(4): p. 263-273.
51. Hsing, A.W. and A.P. Chokkalingam, *Prostate cancer epidemiology*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 1388-413.
52. MacInnis, R.J. and D.R. English, *Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis*. *Cancer Causes Control*, 2006. **17**(8): p. 989-1003.
53. MacInnis, R. and D. English, *Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis*. *Cancer Causes & Control*, 2006. **17**(8): p. 989-1003.
54. Fuemmeler, B.F., M.K. Pendzich, and K.P. Tercyak, *Weight, dietary behavior, and physical activity in childhood and adolescence: implications for adult cancer risk*. *Obes Facts*, 2009. **2**(3): p. 179-86.
55. LeRoith, D., et al., *Obesity and type 2 diabetes are associated with an increased risk of developing cancer and a worse prognosis; epidemiological and mechanistic evidence*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2008. **116 Suppl 1**: p. S4-6.
56. Hirsch, H.A., et al., *Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission*. *Cancer Res*, 2009. **69**(19): p. 7507-11.
57. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
58. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
59. Van Waes, C., *Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(4): p. 1076-82.
60. Chen, X., et al., *The reciprocal relationship between adiponectin and LOX-1 in the regulation of endothelial dysfunction in ApoE knockout mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(3): p. H605-12.
61. Mehta, J.L., et al., *Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(1): p. 36-45.
62. Khaidakov, M., et al., *Oxidized LDL receptor 1 (OLR1) as a possible link between obesity, dyslipidemia and cancer*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20277.
63. Khaidakov, M. and J.L. Mehta, *Oxidized LDL triggers pro-oncogenic signaling in human breast mammary epithelial cells partly via stimulation of MiR-21*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46973.
64. Migita, T., et al., *Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(7): p. 519-32.
65. Shah, U.S., et al., *Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma*. *Hum Pathol*, 2006. **37**(4): p. 401-9.
66. Li, J., et al., *Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues*. *Int J Cancer*, 1994. **57**(3): p. 348-52.
67. Kumar-Sinha, C., et al., *Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis*. *Cancer Res*, 2003. **63**(1): p. 132-9.

68. Chen, Y. and M. Hughes-Fulford, *Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2*. Int J Cancer, 2001. **91**(1): p. 41-5.
69. Pelton, K., M.R. Freeman, and K.R. Solomon, *Cholesterol and prostate cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2012. **12**(6): p. 751-9.
70. *Cholesterol and prostate cancer*. Harv Mens Health Watch, 2011. **15**(11): p. 6-7.
71. Mohamedali, H.Z., et al., *Changes in blood glucose and cholesterol levels due to androgen deprivation therapy in men with non-metastatic prostate cancer*. Can Urol Assoc J, 2011. **5**(1): p. 28-32.
72. Twiddy, A.L., C.G. Leon, and K.M. Wasan, *Cholesterol as a potential target for castration-resistant prostate cancer*. Pharm Res, 2011. **28**(3): p. 423-37.
73. Goldenberg, S.L., et al., *Clinical Experience with Intermittent Androgen Suppression in Prostate Cancer: Minimum of 3 Years' Follow-Up*. Mol Urol, 1999. **3**(3): p. 287-292.
74. Schroder, F.H., *Progress in understanding androgen-independent prostate cancer (AIPC): a review of potential endocrine-mediated mechanisms*. Eur Urol, 2008. **53**(6): p. 1129-37.
75. Mostaghel, E.A. and P.S. Nelson, *Intracrine androgen metabolism in prostate cancer progression: mechanisms of castration resistance and therapeutic implications*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. **22**(2): p. 243-58.
76. Montgomery, R.B., et al., *Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4447-54.
77. Kraemer, F.B., et al., *The LDL receptor is not necessary for acute adrenal steroidogenesis in mouse adrenocortical cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(2): p. E408-12.
78. Wan, F., et al., *Oxidized low-density lipoprotein is associated with advanced-stage prostate cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(5): p. 3573-82.
79. Demierre, M.F., et al., *Statins and cancer prevention*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(12): p. 930-42.
80. Murtola, T.J., et al., *Statins and prostate cancer prevention: where we are now, and future directions*. Nat Clin Pract Urol, 2008. **5**(7): p. 376-87.
81. Hoque, A., H. Chen, and X.C. Xu, *Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(1): p. 88-94.
82. Lee, S.J., et al., *Inhibition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase pathway induces p53-independent transcriptional regulation of p21(WAF1/CIP1) in human prostate carcinoma cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10618-23.
83. Parish, C.A. and R.R. Rando, *Isoprenylation/methylation of proteins enhances membrane association by a hydrophobic mechanism*. Biochemistry, 1996. **35**(26): p. 8473-7.
84. Arozarena, I., et al., *The Rho family GTPase Cdc42 regulates the activation of Ras/MAP kinase by the exchange factor Ras-GRF*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26441-8.

85. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 2003. **112**(4): p. 453-65.
86. Siclari, V.A., T.A. Guise, and J.M. Chirgwin, *Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 621-33.
87. Guarino, M., B. Rubino, and G. Ballabio, *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*. Pathology, 2007. **39**(3): p. 305-18.
88. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 333-9.
89. Tepass, U., et al., *Cadherins in embryonic and neural morphogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 91-100.
90. Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 6958-69.
91. Moreno-Bueno, G., et al., *The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition*. Nat Protoc, 2009. **4**(11): p. 1591-613.
92. Maruta, H., et al., *G proteins, phosphoinositides, and actin-cytoskeleton in the control of cancer growth*. Microsc Res Tech, 1999. **47**(1): p. 61-6.
93. Yamazaki, D., S. Kurisu, and T. Takenawa, *Regulation of cancer cell motility through actin reorganization*. Cancer Sci, 2005. **96**(7): p. 379-86.
94. Borisy, G.G. and T.M. Svitkina, *Actin machinery: pushing the envelope*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(1): p. 104-12.
95. Lin, Y.H., et al., *Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1*. J Cell Biol, 2004. **165**(3): p. 421-32.
96. Gupta, G.P. and J. Massague, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. **127**(4): p. 679-95.
97. Liang, X., *EMT: new signals from the invasive front*. Oral Oncol, 2011. **47**(8): p. 686-7.
98. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 374-83.
99. Polyak, K. and R.A. Weinberg, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 265-73.
100. Yang, J. and R.A. Weinberg, *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 818-29.
101. Price, R.S., et al., *Obesity-related systemic factors promote an invasive phenotype in prostate cancer cells*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2012. **15**(2): p. 135-43.
102. Wang, R., et al., *Role of LOX-1 and ROS in oxidized low-density lipoprotein induced epithelial-mesenchymal transition of NRK52E*. Lipids Health Dis, 2010. **9**: p. 120.
103. Liang, M., P. Zhang, and J. Fu, *Up-regulation of LOX-1 expression by TNF-alpha promotes trans-endothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells*. Cancer Lett, 2007. **258**(1): p. 31-7.
104. Aggarwal, B.B., et al., *Inflammation and cancer: how hot is the link?* Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1605-21.

105. Dedieu, S. and B. Langlois, *LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells*. Cell Adh Migr, 2008. **2**(2): p. 77-80.
106. Song, H., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9*. Cancer Res, 2009. **69**(3): p. 879-86.
107. Xu, S., et al., *LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(16): p. 2859-72.
108. Fernández, L.I.L., *Expresión y función del receptor LOX-1 en células humanas normales y tumorales*, in *Doctorado en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular* 2009, Universidad De Concepción: Chile.
109. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
110. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-37.
111. Ribatti, D., *Cancer stem cells and tumor angiogenesis*. Cancer Lett, 2012. **321**(1): p. 13-7.
112. Li, W.W., et al., *Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention*. J Oncol, 2012. **2012**: p. 879623.
113. Moserle, L. and O. Casanovas, *Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance*. J Intern Med, 2012.
114. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
115. Kapoor, P. and R. Deshmukh, *VEGF: A critical driver for angiogenesis and subsequent tumor growth: An IHC study*. J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(3): p. 330-7.
116. Avni, R., B. Cohen, and M. Neeman, *Hypoxic stress and cancer: imaging the axis of evil in tumor metastasis*. NMR Biomed, 2011. **24**(6): p. 569-81.
117. Meng, F., R. Henson, and T. Patel, *Chemotherapeutic stress selectively activates NF-kappa B-dependent AKT and VEGF expression in liver cancer-derived endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(2): p. C749-60.
118. Maulik, N. and D.K. Das, *Redox signaling in vascular angiogenesis*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(8): p. 1047-60.
119. Garbin, U., et al., *Effects of nebivolol on endothelial gene expression during oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells*. Mediators Inflamm, 2008. **2008**: p. 367590.
120. Dandapat, A., et al., *Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2435-42.
121. Hu, C., A. Dandapat, and J.L. Mehta, *Angiotensin II induces capillary formation from endothelial cells via the LOX-1 dependent redox-sensitive pathway*. Hypertension, 2007. **50**(5): p. 952-7.
122. Inomata, Y., et al., *Suppression of choroidal neovascularization in lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor type 1-deficient mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(8): p. 3970-6.

123. Khaidakov, M., et al., *Antiangiogenic and antimetabolic effects of aspirin in hypoxia-reoxygenation modulation of the LOX-1-NADPH oxidase axis as a potential mechanism*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **56**(6): p. 635-41.
124. Giannoni, E., M. Parri, and P. Chiarugi, *EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy*. Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(11): p. 1248-63.
125. Pischon, T., U. Nothlings, and H. Boeing, *Obesity and cancer*. Proc Nutr Soc, 2008. **67**(2): p. 128-45.
126. De Giuseppe, R., et al., *Correlation between salivary and serum oxidized LDL levels: a pilot study on overweight/obese subjects*. J Oral Pathol Med, 2015. **44**(10): p. 884-7.
127. Bausenwein, J., et al., *Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and of catalase activity in follicular fluid of obese women*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(2): p. 117-24.
128. Couillard, C., et al., *Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(12): p. 6454-9.
129. Sawamura, T., I. Wakabayashi, and T. Okamura, *LOX-1 in atherosclerotic disease*. Clin Chim Acta, 2015. **440**: p. 157-63.
130. Lubrano, V. and S. Balzan, *LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage*. Free Radic Res, 2014. **48**(8): p. 841-8.
131. Yan, M., J.L. Mehta, and C. Hu, *LOX-1 and obesity*. Cardiovasc Drugs Ther, 2011. **25**(5): p. 469-76.
132. Macleod, L.C., et al., *Metabolic syndrome, dyslipidemia and prostate cancer recurrence after primary surgery or radiation in a veterans cohort*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2015. **18**(2): p. 190-5.
133. Andreassen, O.A., et al., *Shared common variants in prostate cancer and blood lipids*. Int J Epidemiol, 2014. **43**(4): p. 1205-14.
134. Michaelsen, F.W., et al., *Activity of Artemisia annua and artemisinin derivatives, in prostate carcinoma*. Phytomedicine, 2015. **22**(14): p. 1223-31.
135. Ando, K. and T. Fujita, *Role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in the development of hypertensive organ damage*. Clin Exp Nephrol, 2004. **8**(3): p. 178-82.
136. Bai, J., et al., *Sleeve gastrectomy prevents lipoprotein receptor-1 expression in aortas of obese rats*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(32): p. 3739-44.
137. Dominguez, J.H., et al., *Anti-LOX-1 therapy in rats with diabetes and dyslipidemia: ablation of renal vascular and epithelial manifestations*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(1): p. F110-9.
138. Fukui, M., et al., *LOX-1 is a novel marker for peripheral artery disease in patients with type 2 diabetes*. Metabolism, 2013. **62**(7): p. 935-8.
139. Tatsuguchi, M., et al., *Oxidized LDL receptor gene (OLR1) is associated with the risk of myocardial infarction*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(1): p. 247-50.
140. White, S.J., G.B. Sala-Newby, and A.C. Newby, *Overexpression of scavenger receptor LOX-1 in endothelial cells promotes atherogenesis in the ApoE(-/-) mouse model*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(6): p. 369-73.

141. Chen, M., et al., *Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and AGE*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **287**(4): p. 962-8.
142. Wang, D.D., et al., *Comparison analysis in synchronous and metachronous metastatic colorectal cancer based on microarray expression profile*. *Hepatogastroenterology*, 2014. **61**(136): p. 2215-8.
143. Jiang, L., et al., *Combination of body mass index and oxidized low density lipoprotein receptor 1 in prognosis prediction of patients with squamous non-small cell lung cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(26): p. 22072-80.
144. Pasini, F.S., et al., *A gene expression profile related to immune dampening in the tumor microenvironment is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma*. *J Gastroenterol*, 2014. **49**(11): p. 1453-66.
145. Pirillo, A., et al., *Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) by 15-lipoxygenase-modified LDL in endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2011. **214**(2): p. 331-7.
146. Kelesidis, I., T. Kelesidis, and C.S. Mantzoros, *Adiponectin and cancer: a systematic review*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(9): p. 1221-5.
147. Calle, E.E. and M.J. Thun, *Obesity and cancer*. *Oncogene*, 2004. **23**(38): p. 6365-78.
148. Carr, A.C., M.R. McCall, and B. Frei, *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(7): p. 1716-23.
149. Kettle, A.J., C.J. van Dalen, and C.C. Winterbourn, *Peroxy nitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration*. *Redox Rep*, 1997. **3**(5-6): p. 257-8.
150. Castillo-Tong, D.C., et al., *Association of myeloperoxidase with ovarian cancer*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(1): p. 141-8.
151. Drosner, R.A., et al., *High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64814.
152. Zhou, Y.Y., et al., *Myeloperoxidase G463A polymorphism and lung cancer risk in Asians: a pooled analysis*. *Tumour Biol*, 2013. **34**(5): p. 3035-9.
153. Ding, G., et al., *[Association between the myeloperoxidase gene polymorphisms and the susceptibility to prostate cancer: a case-control study in a Chinese population]*. *Actas Urol Esp*, 2013. **37**(2): p. 79-82.
154. Hiramatsu, K., et al., *Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes*. *Arteriosclerosis*, 1987. **7**(1): p. 55-60.
155. Miller, A.A., et al., *Augmented superoxide production by Nox2-containing NADPH oxidase causes cerebral artery dysfunction during hypercholesterolemia*. *Stroke*, 2010. **41**(4): p. 784-9.
156. Szatrowski, T.P. and C.F. Nathan, *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. *Cancer Res*, 1991. **51**(3): p. 794-8.
157. Roy, K., et al., *NADPH oxidases and cancer*. *Clin Sci (Lond)*, 2015. **128**(12): p. 863-75.

158. Zhang, C., et al., *NOX4 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and metastasis through positive feedback regulation of PI3K/Akt signaling*. *Oncotarget*, 2014. **5**(12): p. 4392-405.
159. Takahashi, Y., H. Zhu, and T. Yoshimoto, *Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis*. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**(3-4): p. 425-31.
160. Parthasarathy, S., E. Wieland, and D. Steinberg, *A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(3): p. 1046-50.
161. Rankin, S.M., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages*. *J Lipid Res*, 1991. **32**(3): p. 449-56.
162. Kerjaschki, D., et al., *Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(5): p. 2000-12.
163. Guo, A.M., et al., *Role of 12-lipoxygenase in regulation of ovarian cancer cell proliferation and survival*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. **68**(5): p. 1273-83.
164. Kelavkar, U.P., et al., *Overexpression of 12/15-lipoxygenase, an ortholog of human 15-lipoxygenase-1, in the prostate tumors of TRAMP mice*. *Neoplasia*, 2004. **6**(6): p. 821-30.
165. Sarveswaran, S., et al., *Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in prostate cancer cells via down-regulation of protein kinase C-epsilon*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(12): p. 2108-17.
166. Tellis, C.C. and A.D. Tselepis, *The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1791**(5): p. 327-38.
167. Tew, D.G., et al., *Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(4): p. 591-9.
168. Rao, C.V., et al., *Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A2, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities, and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor promotion in male F344 rats*. *Cancer Res*, 1996. **56**(3): p. 532-7.
169. Heinloth, A., et al., *Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(10): p. 1819-25.
170. Wang, W.Y., et al., *OxLDL stimulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression in THP-1 monocytes via PI3K and p38 MAPK pathways*. *Cardiovasc Res*, 2010. **85**(4): p. 845-52.
171. Fair, A. and K.A. Pritchard, Jr., *Oxidized low density lipoprotein increases U937 cell 5-lipoxygenase activity: induction of 5-lipoxygenase activating protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **201**(2): p. 1014-20.
172. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets*. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1359-70.

173. Hutter, R., et al., *Macrophages transmit potent proangiogenic effects of oxLDL in vitro and in vivo involving HIF-1alpha activation: a novel aspect of angiogenesis in atherosclerosis*. J Cardiovasc Transl Res, 2013. **6**(4): p. 558-69.
174. Riazzy, M., J.H. Chen, and U.P. Steinbrecher, *VEGF secretion by macrophages is stimulated by lipid and protein components of OxLDL via PI3-kinase and PKCzeta activation and is independent of OxLDL uptake*. Atherosclerosis, 2009. **204**(1): p. 47-54.
175. Salomonsson, L., et al., *Post-transcriptional regulation of VEGF expression by oxidised LDL in human macrophages*. Eur J Clin Invest, 2002. **32**(10): p. 767-74.
176. Kang, J.H., et al., *Ascochlorin suppresses oxLDL-induced MMP-9 expression by inhibiting the MEK/ERK signaling pathway in human THP-1 macrophages*. J Cell Biochem, 2007. **102**(2): p. 506-14.
177. Li, H.X., et al., *Involvement of calcium-sensing receptor in oxLDL-induced MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via PI3K/Akt pathway*. Mol Cell Biochem, 2012. **362**(1-2): p. 115-22.
178. Dugonjic, A.S., et al., *Significance of microvessel density in prostate cancer core biopsy*. Vojnosanit Pregl, 2015. **72**(4): p. 317-27.
179. Adesunloye, B.A., F.H. Karzai, and W.L. Dahut, *Angiogenesis inhibitors in the treatment of prostate cancer*. Chem Immunol Allergy, 2014. **99**: p. 197-215.
180. Llaverias, G., et al., *A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer*. Am J Pathol, 2010. **177**(6): p. 3180-91.
181. KUMAR, A.A., in *Patologia Humana de Robbins, Capitulo 6, Neoplasias*, Elsevier, Editor 2010.
182. Mareel, M. and A. Leroy, *Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion*. Physiol Rev, 2003. **83**(2): p. 337-76.
183. Voulgari, A. and A. Pintzas, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(2): p. 75-90.
184. Selgas, R., et al., *[Epithelial-mesenchymal transition in fibrosing processes. Mesothelial cells obtained ex vivo from patients treated with peritoneal dialysis as transdifferentiation model]*. Nefrologia, 2004. **24**(1): p. 34-9.
185. Neal, C.L., et al., *Snail transcription factor negatively regulates maspin tumor suppressor in human prostate cancer cells*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 336.
186. Bhardwaj, A., et al., *Restoration of PPP2CA expression reverses epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses prostate tumour growth and metastasis in an orthotopic mouse model*. Br J Cancer, 2014. **110**(8): p. 2000-10.
187. Uygur, B. and W.S. Wu, *SLUG promotes prostate cancer cell migration and invasion via CXCR4/CXCL12 axis*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 139.
188. Smith, B.N. and V.A. Odero-Marrah, *The role of Snail in prostate cancer*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(5): p. 433-41.
189. Bedel, A., et al., *E-cadherin/beta-catenin/T-cell factor pathway is involved in smooth muscle cell proliferation elicited by oxidized low-density lipoprotein*. Circ Res, 2008. **103**(7): p. 694-701.

190. Kushiro, K. and N.P. Nunez, *Ob/ob serum promotes a mesenchymal cell phenotype in B16BL6 melanoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2011. **28**(8): p. 877-86.
191. Zhang, F., et al., *Ox-LDL promotes migration and adhesion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulation of MCP-1 expression*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 691023.
192. Park, Y.M., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 136-45.
193. Liu, J., et al., *Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin*. Int J Mol Med, 2014. **33**(5): p. 1341-7.
194. Singh, D., et al., *Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs)*. Front Mol Biosci, 2015. **2**: p. 19.
195. Gialeli, C., A.D. Theocharis, and N.K. Karamanos, *Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting*. FEBS J, 2011. **278**(1): p. 16-27.
196. Van Damme, J., S. Struyf, and G. Opdenakker, *Chemokine-protease interactions in cancer*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(3): p. 201-8.
197. Brown, G.T. and G.I. Murray, *Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis*. J Pathol, 2015. **237**(3): p. 273-81.
198. Paim, L.R., et al., *Oxidized low-density lipoprotein, matrix-metalloproteinase-8 and carotid atherosclerosis in spinal cord injured subjects*. Atherosclerosis, 2013. **231**(2): p. 341-5.
199. Sini, S., et al., *Evidence for an exclusive association of matrix metalloproteinase-9 with dysfunctional high-density lipoprotein: a novel finding*. Atherosclerosis, 2014. **236**(1): p. 162-8.
200. Yang, K., et al., *Toll-like receptor 4 mediates inflammatory cytokine secretion in smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95935.
201. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
202. Yamaguchi, H. and J. Condeelis, *Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(5): p. 642-52.
203. Wang, X., et al., *LOX-1 in the maintenance of cytoskeleton and proliferation in senescent cardiac fibroblasts*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **60**: p. 184-90.
204. Zhao, Y., H. Yu, and W. Hu, *The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(3): p. 180-9.
205. Mattaliano, M.D., et al., *ROCK2 associates with lectin-like oxidized LDL receptor-1 and mediates oxidized LDL-induced IL-8 production*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(5): p. C1180-7.
206. Sinha, S. and W. Yang, *Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42*. Cell Signal, 2008. **20**(11): p. 1927-34.

207. Jara, C., *Función de Rho y Rac1 en la EMT de células de Cáncer de próstata DU-145*, in *Departamento de Bioquímica e Inmunología 2013*, Universidad de Concepción.
208. Policastro, L.L., et al., *The tumor microenvironment: characterization, redox considerations, and novel approaches for reactive oxygen species-targeted gene therapy*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(8): p. 854-95.
209. Yang, C.M., et al., *Mitogenic effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway*. *Br J Pharmacol*, 2001. **132**(7): p. 1531-41.
210. Seibold, S., et al., *Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(12): p. 3026-34.
211. Zettler, M.E., et al., *OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **284**(2): p. H644-53.
212. Zhang, Z., et al., *Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by combined mechanical stress and oxLDL through LOX-1 pathway*. *Cell Signal*, 2013. **25**(1): p. 332-40.
213. Diakowska, D., et al., *Circulating Oxidized Low-Density Lipoproteins and Antibodies against Oxidized Low-Density Lipoproteins as Potential Biomarkers of Colorectal Cancer*. *Gastroenterol Res Pract*, 2015. **2015**: p. 146819.
214. Crespo-Sanjuan, J., et al., *Early detection of high oxidative activity in patients with adenomatous intestinal polyps and colorectal adenocarcinoma: myeloperoxidase and oxidized low-density lipoprotein in serum as new markers of oxidative stress in colorectal cancer*. *Lab Med*, 2015. **46**(2): p. 123-35.
215. Keshk, W.A., et al., *Fatty acid synthase/oxidized low-density lipoprotein as metabolic oncogenes linking obesity to colon cancer via NF-kappa B in Egyptians*. *Med Oncol*, 2014. **31**(10): p. 192.
216. Suzuki, K., et al., *Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: a case-control study nested in the Japan Collaborative Cohort Study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(11 Pt 1): p. 1781-7.
217. Delimaris, I., et al., *Oxidized LDL, serum oxidizability and serum lipid levels in patients with breast or ovarian cancer*. *Clin Biochem*, 2007. **40**(15): p. 1129-34.