



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Farmacia -Programa de Magíster en Bioquímica Clínica e
Inmunología

**“INDUCCIÓN DE LOX-1 POR LPS BACTERIANO Y SU ASOCIACIÓN EN LA
PROGRESIÓN TUMORAL EN CÁNCER COLORRECTAL HUMANO”**

Tesis para optar al Grado de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

YOSSELYN JEANNETTE VARGAS VILLARROEL

CONCEPCIÓN-CHILE

2018

Profesor Guía: Jorge R. Toledo Alonso

Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

“La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa”. -Mahatma Gandhi.



Esta tesis va dedicada a mis papás: Frudelin y Janette, la cual también es fruto de su esfuerzo. Todos mis logros, son suyos.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de Magíster fue realizada bajo la tutela del Dr. Jorge R. Toledo Alonso, del la cual estoy muy agradecida ya que ha sido un gran apoyo en el desarrollo de este trabajo, sobre todo por su gestión, paciencia y optimismo.

Además, agradecer al departamento de Bioquímica Clínica por permitir entrar al programa de Magister, sobre todo al Director Claudio Aguayo, por sus gestiones, disponibilidad ante cualquier circunstancia, amabilidad y paciencia con cada una de nosotras.

Agradecer al departamento de Fisiopatología por abrirme las puertas, permitir realizar mi tesis de magister y haberme dado la oportunidad de aprender y participar como colaborador docente.

Agradecer a CONICYT por otórgame la beca CONICYT de Magister y permitir financiarme en este proceso durante el desarrollo del programa.

Además, agradecer a todos mis compañeros, profesores y amigos de laboratorio LBB, donde se ha formado un ambiente grato de trabajo y sobre todo algunos lazos de amistad y compañerismo. Agradecer sobre todo a mi compañero de trabajo Eddy Ernesto por toda la ayuda que recibí de su parte en el desarrollo de esta tesis, tanto por ser mi compañero y sobre todo por apoyarme rigurosamente en la escritura, por ayudarme en todo lo que he necesitado y por la perseverancia que pone día a día en su trabajo.

A mi familia, de la cual me siento afortunada, papi, mami, Tatan, Yuly y Tati que siempre han sido un apoyo fundamental en mi vida, por enseñarme a nunca rendirme, esforzarme al máximo, por amarme y estar presentes en todos los procesos importantes en mi vida, una vez más este logro es de ustedes.

A mis amigas del Magister: Danitza y Camila que fue una suerte haberlas conocido, ya que hemos compartido tantas alegrías, risas, momentos estresantes en el magister, pero sobre todo los momentos inmemorables.

A mis amigas de la vida: Paulina y Tatiana que siempre están ahí a pesar de todo, que me entregan día a día su apoyo incondicional, sus consejos, su cariño y amor que en esta etapa de mi vida ha sido fundamental.

Por último, a mi pololo José Rodolfo, esa personita que esta ahí apoyándome de todas las formas posibles, que ha tenido la paciencia para soportarme en esta última etapa, que me saca una sonrisa cada día y que me ama tanto como yo a él.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIACIONES.....	VIII
INDICE DE FIGURAS	XIV
INDICE DE TABLAS	XVI
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY	XIX
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DEFINICIÓN GENERAL DEL CÁNCER, EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL E INTRODUCCIÓN A LA PROBLEMÁTICA.....	1
1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CÁNCER, MIGRACIÓN, INVASIÓN Y METÁSTASIS EN CCR.	5
1.3 TUMORES COLORRECTALES, CLASIFICACIÓN, DETECCIÓN Y TRATAMIENTO.	8
1.4 ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO EN CCR.....	10
1.5 EII, MICROBIOTA Y SU RELACIÓN CON CCR.....	13
1.6 RELACIÓN ENTRE OBESIDAD, ESTRÉS OXIDATIVO Y NIVELES DE LDLOX EN CÁNCER....	16
1.7 LOX-1 Y SU RELACIÓN CON CCR.	18
1.8 EFECTO DEL LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO SOBRE LA PROGRESIÓN TUMORAL Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE LOX-1.....	21
2 PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
2.1 PROBLEMA.....	24
2.2 PREGUNTA.....	24
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
3.1 HIPÓTESIS.	25
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	25
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	26
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1 MATERIALES.....	27

4.1.1	Material biológico.....	27
4.1.2	Reactivos y materiales.....	27
4.1.3	Equipos e instrumentos.	30
4.2	MÉTODOS.	31
4.2.1	Cultivo de líneas celulares.....	31
4.2.2	Obtención y oxidación de la LDL.	32
4.2.3	Recuento de células en cultivo.	33
4.2.4	Tratamientos con LPS y LDL oxidada.....	34
4.2.5	Ensayos de viabilidad celular por reducción de sales de <i>Tetrazolio</i>	34
4.2.6	Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	35
4.2.7	Separación de proteínas mediante SDS-PAGE y western blot.	35
4.2.8	Inmunofluorescencia.....	38
4.2.9	Purificación de ARN.	38
4.2.10	Análisis de ARN.....	39
4.2.11	Zimografía.	40
4.2.12	Ensayo clonogénico.	41
4.2.13	Ensayo de migración e invasión por Transwell.	41
4.2.14	Análisis Estadístico.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	EFFECTO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA VIABILIDAD DE LÍNEAS CELULARES DE CCR HUMANO.....	44
5.2	EXPRESIÓN BASAL DE LOX-1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON.	47
5.3	EFFECTO INDIVIDUAL Y COMBINADO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOX-1 Y TLR-4.	49
5.4	EFFECTO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL.	56
5.5	EFFECTO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEINASAS DE MATRIZ.....	61
5.6	EFFECTO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA FORMACIÓN DE COLONIAS DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CCR HUMANO.....	63

5.7	EFFECTO DEL CO-TRATAMIENTO LPS Y LDLOX SOBRE LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DE CCR HUMANO.....	66
5.8	EFFECTO DEL CO-TRATAMIENTO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA INVASIÓN DE LAS CÉLULAS DE CCR HUMANO.....	68
6	DISCUSIÓN.....	70
7	BIBLIOGRAFÍA.....	85
8	ANEXOS	99
8.1	CONSENTIMIENTO INFORMADO DONACIÓN DE SANGRE.....	99
8.2	PROTOCOLO MANIPULACIÓN DE MATERIALES Y DESECHOS.	101
8.3	ETAPIFICACIÓN DEL CCR.....	105



ABREVIACIONES

ACTB: Gen que codifica para la proteína β -actina.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos.

AJCC: Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (*American Joint Committee on Cancer*).

APC: Adenomatous polyposis coli o gen de la poliposis adenomatosa coli.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATCC: Colección Estadounidense de cultivos (*American Type Culture Collection*).

BCA: Ácido bicinconánico para cuantificación de proteínas.

BHT: Butil hidroxitolueno (E-321), *antioxidante* sintético procedente de la industria petrolera.

BIOMYC-3: Solución antibiótica para la eliminación de mycoplasma.

BSA: Albúmina de suero de bovino.

Caco-2: Línea celular continua de células heterogéneas de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano.

CCR: Cáncer colorrectal.

CDH-1: Gen que codifica para la proteína E-cadherina.

CHO: Células derivadas de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) (*Chinese hamster ovary*).

COLO320: Línea celular proveniente de un tumor primario de grado Dukes tipo C femenino.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

CpG: o islas CpG son regiones de ADN que conforman un 40% de promotores de los genes de mamíferos. Regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos. Los sitios CpG en las islas CpG están desmetilados si los genes están expresados.

CTLD: dominio C-terminal extracelular tipo lectina de LOX-1, encargado del reconocimiento de LDLox.

CU: Colitis Ulcerativa.

DEPC: Dietilpirocarbonato utilizado en agua grado biología molecular para manipulación de RNA.

DMEM: Medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle*.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético utilizado como agente quelante.

EC: Enfermedad de Crohn.

ECV: Enfermedad Cardiovascular.

Ells: Enfermedades Inflamatorias del Intestino.

ERDOs: Especies Reactivas del Oxígeno.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

HCT116: Línea celular proveniente de un tumor primario de grado Dukes tipo D masculino.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

HEK293 FT: Células embrionarias de riñón humano 293, célula anfitriona para la producción lentiviral.

HEK (LOX+): Células de riñón embrionario humano que sobreexpresan LOX-1 las que fueron generadas en nuestro laboratorio.

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells.

ICAM: Intercellular *Adhesion* Molecule 1.

IDL: Lipoproteína de densidad intermedia.

IL-1 β : Interleuquina 1 β .

IL-6: Interleuquina 6.

INC: Instituto Nacional del Cáncer.

Kras: Gen que codifica para la proteína KRAS, que participa en las vías de señalización celular que controlan el crecimiento, la maduración y la muerte de las células.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

LDLn: Lipoproteína de baja densidad nativa (LDL).

LDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada.

LOX-1: Receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidada.

LP(a): Lipoproteína (a).

LPS: Lipopolisacárido.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1.

MDA-MB-231: Línea celular de cáncer de mama.

MEC: Matriz extracelular.

MMPs: Metaloproteinasas de matriz.

MTT: Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol.

MyD88: Myeloid differentiation primary response 88.

NADPH oxidasa: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa.

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center of Biotechnology Information).

NFK- β : Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NLRs: Receptores tipo NOD. Sensores de la respuesta inmune innata que proporcionan respuestas inmediatas contra patógeno o daño tisular. Su activación induce el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, inicia procesos de reparación tisular y da como resultado la activación de la respuesta inmune adaptativa.

NOX-4: NADPH oxidasa 4.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORL-1: Gen del receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidada.

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar.

PBS: Tampón fosfato alcalino.

P38/MAPK: Vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos.

P53: Proteína supresora de tumores.

P65: Factor nuclear NFK- β .

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer. Solución para extracción de proteínas.

RPMI: Medio celular *Roswell Park Memorial Institute*.

RT-PCR: Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa.

SBF: Suero Bovino Fetal.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SW480: Línea celular establecida a partir de una metástasis ganglionar.

SW620: Línea celular aislada de un linfonodo masculino.

TBARs: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.

TEM: Transición epitelio-mesenquimal.

TEMED: Tetrametiletilendiamina.

TWEEN-20: Surfactante hidrofílico.

TLRs: Receptores tipo Toll.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α .

TNM: Sistema de clasificación de tumores malignos (T: tamaño del tumor y diseminación hacia el tejido cercano; N: diseminación del cáncer hasta los ganglios linfáticos; M metástasis).

TP53: Gen de la proteína tumoral p53.

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer.

VCAM: Molécula de Adherencia de Células Vasculares 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1).

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial.

VIM: Gen que codifica para la proteína Vimentina.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. OXIDACIÓN DE LDL A PARTIR DE PLASMA HUMANO.....	33
FIGURA 2. EFECTO INDIVIDUAL DE (A) LDLOX, (B) LDLN, (C) LPS Y COMBINADO (D), (E) Y (F) SOBRE LA VIABILIDAD DE TRES LÍNEAS CELULARES DE CCR HUMANO.....	47
FIGURA 3. EXPRESIÓN BASAL DEL RECEPTOR LOX-1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL HUMANO COLO320, SW620 Y HCT116.....	48
FIGURA 4. EFECTO DE LPS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOX-1 Y TLR-4 EN CÉLULAS COLO320, SW620 Y HCT116 DE CÁNCER COLORRECTAL.....	51
FIGURA 5. EFECTO DE LDLOX SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOX-1 EN CÉLULAS COLO320, SW620 Y HCT116 DE CÁNCER COLORRECTAL.....	52
FIGURA 6. EFECTO DEL CO-TRATAMIENTO LPS/LDLOX SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOX-1 EN CÉLULAS COLO320, SW620 Y HCT116 DE CÁNCER COLORRECTAL HUMANO.....	54
FIGURA 7. EFECTO DEL CO-TRATAMIENTO LPS/LDLOX SOBRE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE LOX-1 EN CÉLULAS COLO320, HCT116 Y SW620 DE CÁNCER COLORRECTAL.....	55
FIGURA 8. EFECTO INDIVIDUAL Y COMBINADO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TEM EN CÉLULAS COLO320, HCT116 Y SW620 DE CÁNCER COLORRECTAL.....	59
FIGURA 9. EFECTO INDIVIDUAL Y COMBINADO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO DE MARCADORES DE TEM EN CÉLULAS COLO320, HCT116 Y SW620 DE CÁNCER COLORRECTAL.....	60
FIGURA 10. EFECTO DE LPS Y LDLOX SOBRE LA ACTIVIDAD DE MMP-9 Y MMP-2 SOBRE CÉLULAS COLO320, HCT116 Y SW620 DE CCR.....	62
FIGURA 11. EFECTO DE LDLOX Y EL CO-TRATAMIENTO LPS/LDLOX SOBRE LA FORMACIÓN DE COLONIAS DE TRES LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL. ENSAYOS CLONOGÉNICOS EN CÉLULAS COLO320, SW620 Y HCT116 DE CÁNCER DE COLORRECTAL HUMANO.....	65

FIGURA 12. EFECTO DEL CO-TRATAMIENTO LPS/LDLOX SOBRE LA MIGRACIÓN DE LAS LÍNEAS COLO320 Y HCT116 DE CÁNCER COLORRECTAL HUMANO..	67
FIGURA 13. EFECTO DEL CO-TRATAMIENTO LPS/LDLOX SOBRE LA INVASIÓN DE LAS LÍNEAS COLO320 Y HCT116 DE CÁNCER COLORRECTAL HUMANO.	69
FIGURA 14. MODELO DE ACTIVACIÓN POR LDLOX E INDUCCIÓN CON LPS SOBRE RECEPTOR <i>SCAVENGER</i> Y SU RELACIÓN EN LA PROGRESIÓN TUMORAL.	84



INDICE DE TABLAS

TABLA 1. ANTICUERPOS PRIMARIOS PARA INMUNODETECCIÓN.	37
TABLA 2. ANTICUERPOS SECUNDARIOS FLUORESCENTES PARA INMUNODETECCIÓN.	37
TABLA 3. CONDICIONES DE RT-PCR CUANTITATIVO	40
TABLA 4. SECUENCIA DE PARTIDORES PARA PCR CUANTITATIVO.....	40
TABLA 5. PROCEDIMIENTO DE MANEJO Y DESECHO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS.....	102
TABLA 6. CLASIFICACION TNM: TUMOR PRIMARIO (T).....	105
TABLA 7. CLASIFICACION TNM: GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N).....	106
TABLA 8. CLASIFICACION TNM: METÁSTASIS DISTANTE (M).	106



RESUMEN

La obesidad, la dislipidemia y las enfermedades inflamatorias del intestino son factores de riesgo para desarrollar cáncer colorrectal, que se han relacionado con niveles elevados de LDLox plasmático y/o un estado inflamatorio, debido a una respuesta alterada contra las bacterias intestinales o la composición alterada de la microflora. A su vez, se ha demostrado que la progresión de varios tipos de cáncer estaría relacionada con la expresión de LOX-1, receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada, ampliamente estudiado en aterosclerosis. En trabajos previos de nuestro laboratorio, se demostró que LOX-1 está implicado en aspectos clave de la progresión del cáncer, como la transición epitelial-mesenquimal, la migración, la angiogénesis y la proliferación celular.

Sin embargo, se desconoce la implicancia del receptor LOX-1 en cáncer colorrectal. Como hipótesis de este trabajo planteamos que el lipopolisacárido bacteriano de *Escherichia coli* estimula la sobreexpresión del receptor LOX-1 e induce la progresión tumoral en líneas celulares de cáncer colorrectal humano, mediado por la activación con LDLox. Para aceptar o rechazar esta hipótesis se propuso como objetivo evaluar si el estímulo con LPS bacteriano induce la sobreexpresión del receptor LOX-1, y se promueve la progresión tumoral en líneas celulares de cáncer colorrectal humano cuando son co-estimulados con LDLox.

Para lograr este objetivo, determinamos las concentraciones de LPS bacteriano y LDL oxidada que indujeron un incremento en la expresión del receptor LOX-1 en las líneas celulares de cáncer colorrectal humano COLO320, SW620 y HCT116. Para ambos estímulos, la concentración de expresión máxima de LOX-1 se seleccionó para el tratamiento combinado. Posteriormente, se analizó la expresión de marcadores de transición epitelio-mesenquimal, la actividad gelatinasa de las metaloproteinasas de matriz extracelular MMP-2 y MMP9, así como el efecto de los tratamientos individuales o combinados en los procesos de crecimiento, migración e invasión celular.

En este trabajo, demostramos que LPS y LDLox promueven la sobreexpresión diferencial de LOX-1 en cada línea celular analizada. El tratamiento combinado de LPS y LDLox promovió la transición epitelio-mesenquimal mediante la disminución de marcadores epiteliales (E-cadherina y placoglobina) y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina). Además, hubo una mayor actividad de MMP-2 y MMP-9, enzimas relacionadas con procesos de migración e invasión de células de cáncer colorrectal, en dos de las líneas celulares estudiadas. Finalmente, en ensayos *transwell*, la migración y la invasión celular aumentaron en dos de las líneas celulares estudiadas después del tratamiento con LPS/LDLox. En conclusión, la activación de LOX-1 por LPS y LDLox promueve la transición epitelio-mesenquimal y favorece la migración e invasión de células humanas de cáncer colorrectal.

SUMMARY

Obesity, dyslipidemia and inflammatory bowel diseases are risk factors to develop colorectal cancer that has been related to increased levels of plasmatic oxLDL and to an inflammatory state due to an altered response against gut bacteria or altered microflora composition. Moreover, the expression levels of the oxidized LDL receptor LOX-1, a widely-studied receptor in atherosclerosis, have been related to cancer progression in prostate, gastric, pancreatic and colorectal cancer. In previous works from our laboratory, it was demonstrated that LOX-1 is implicated in key aspects of cancer progression like epithelial to mesenchymal transition, migration, angiogenesis y cellular proliferation.

However, the implication of LOX-1 receptor in colorectal cancer is unknown. We hypothesize that the bacterial lipopolysaccharide of *Escherichia coli* induces the overexpression of LOX-1 receptor and stimulates tumor progression of human colorectal cancer cell lines, mediated by the activation with LDLox. To accept or reject this hypothesis, the objective of this study was to evaluate if the stimulus with bacterial LPS induces overexpression of the LOX-1 receptor, and tumor progression in human colorectal cancer cell lines when they are co-stimulated with LDLox.

To accomplish this objective, we determined the concentrations of bacterial LPS and oxidized LDL that induced an increment in LOX-1 expression in the human colorectal cancer cell lines COLO320, SW620 and HCT116. For

both stimuli, the concentration of maximum LOX-1 expression was selected for the combined treatment. Then, we analyzed the expression of epithelial to mesenchymal transition markers, gelatinase activity of MMP-2 and MMP-9 matrix metalloproteinase, as well as the effect of the individual/combined treatment in cellular growth, migration and invasion.

In this work, we demonstrated that LPS and oxLDL promote differentially LOX-1 overexpression in each cell line assayed. The combined treatment of LPS and oxLDL promoted epithelial to mesenchymal transition through the decrease of epithelial markers (E-cadherin and plakoglobin) and an increase in the expression of mesenchymal markers (vimentin). Besides, there was an increased activity of MMP-2 and MMP-9, enzymes related to migration and invasion processes of colorectal cancer cells, in two of the cell lines studied. Finally, in transwell assays, cellular migration and invasion were increased in two of the cell lines studied after treatment with LPS / oxLDL. In conclusion, the activation of LOX-1 by LPS and oxLDL promotes epithelial to mesenchymal transition and favors migration and invasion of human colorectal cancer cells.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Definición general del cáncer, epidemiología del cáncer colorrectal e introducción a la problemática.

El cáncer, neoplasia o tumor maligno, es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que tienen como característica la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales (OMS, 2015). Las neoplasias, pueden invadir tejidos adyacentes o propagarse a otros órganos, en un proceso conocido como metástasis, siendo ésta la principal causa de muerte por cáncer en el mundo (OMS, 2015). En el año 2015 se estimaron alrededor de 17,5 millones de nuevos casos y 8,7 millones de muertes por cáncer a nivel mundial (Fitzmaurice et al., 2017). Con respecto a nuestro país, se documentaron 40.000 nuevos casos y 25.000 muertes por cáncer, considerándose el segundo motivo de decesos antecedido por las enfermedades cardiovasculares (ECV) (International Agency for Research on Cancer; Medina y Kaempffer, 2001). De acuerdo a las estimaciones de GLOBOCAN, se predice un aumento a 19,3 millones de nuevos casos de cáncer por año para el 2025, debido al crecimiento y envejecimiento de la población mundial (International Agency for Research on Cancer).

En términos generales, el origen del cáncer se remonta al material genético de la célula, el cual puede dañarse o verse alterado. Esto produce mutaciones

que afectan al crecimiento y la división normal de las células, lo que induce un aumento descontrolado de la tasa proliferativa y la activación de mecanismos de resistencia a la muerte celular. Este proceso promueve que las células alteradas formen parte de una masa de tejido o tumor (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

El cáncer colorrectal (CCR), dentro de la clasificación de tumores sólidos, es uno de los más comunes y agresivos a nivel mundial. Un 8,6% del total de las muertes por cáncer en Chile en el año 2012 se debieron al CCR, considerándose la segunda causa de mortalidad por cáncer después del cáncer gástrico (International Agency for Research on Cancer; Kuipers et al., 2015).

El CCR se define como un tumor maligno que se origina dentro de las paredes del intestino grueso y que en la mayoría de los casos comienza con un pólipo (Instituto Nacional del Cáncer, 2015). De acuerdo a su origen, la gran parte de los CCR son esporádicos (90%), lo que significa que no existe ningún antecedente familiar ni personal conocido (Minsal, 2013). Sin embargo, una pequeña proporción de casos de CCR tienen un componente hereditario, entre ellas: la poliposis adenomatosa familiar (PAF) (0,01%) y el síndrome de Lynch (5-10%) (Al-Sukhni, Aronson, y Gallinger, 2008). Hoy en día, el CCR se posiciona en el tercer lugar de las neoplasias con mayor incidencia con 1,7 millones de nuevos casos y mortalidad con 832.000 muertes a nivel mundial (Fitzmaurice et al., 2017). En cuanto al pronóstico, éste está relacionado con el grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal y la presencia o

ausencia de compromiso ganglionar, siendo estas dos características la base de todos los sistemas desarrollados para clasificar esta enfermedad (Minsal, 2013). Con respecto a su reincidencia, se ha documentado que una cantidad no despreciable de pacientes pueden desarrollar recurrencia local o metástasis luego de 5 años posterior a la resección quirúrgica (Hsu et al., 2011). Es por esta razón, la importancia de encontrar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de este tipo de neoplasia. No obstante, para ello se debe indagar a fondo los mecanismos responsables implicados en la progresión del CCR.

Dentro de los mecanismos implicados en el desarrollo de los tumores, la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox), se ha relacionado a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, ovario, próstata, gástrico y cáncer colorrectal (Chen et al., 2015; Delimaris et al., 2007; Giovannucci, 2007; González-Chavarría et al., 2014; Mantovani et al., 2008; Pischon, Nöthlings, y Boeing, 2008; Suzuki et al., 2004). Dicha lipoproteína está ampliamente estudiada en los procesos relacionados a aterosclerosis y es reconocida e internalizada por el receptor de membrana LOX-1, miembro de la familia de receptores “*scavenger*” (Sawamura et al., 1997; Yamada et al., 1998). Estudios preliminares de nuestro laboratorio han evidenciado que la activación de LOX-1 por su ligando LDLox promueve procesos de proliferación celular y angiogénesis, e invasión celular medido por un aumento en la actividad de metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9 en células de cáncer prostático (González-Chavarría et al., 2014). Además, se ha demostrado que la expresión

de LOX-1 en tumores colorrectales se encuentra extremadamente aumentada comparado con su expresión en la mucosa de colón normal (Murdocca et al., 2016). Más aún, este receptor también se encontró sobreexpresado en adenomas, lo que sugeriría una modulación de los tumores desde sus etapas iniciales (Murdocca et al., 2016). Lo mismo sucede en cáncer gástrico, donde los niveles de expresión del receptor se encuentran aumentados con respecto a sujetos sanos (Li et al., 2017).

Está demostrada la relación entre los niveles plasmáticos de LDLox con el riesgo de desarrollar CCR (Suzuki et al., 2004). Otro factor de riesgo para desarrollar CCR son las Enfermedades Inflamatorias Crónicas del intestino grueso (EII) (Terzić et al., 2010). Sin embargo, la etiología de estas patologías no se ha dilucidado completamente.

Una de las hipótesis más aceptadas en relación a las enfermedades inflamatorias intestinales es que la composición global alterada de la microbiota intestinal es altamente relevante (Andoh et al., 2011; Sartor, 2008). Algunas evidencias demuestran que en este tipo de pacientes existe un aumento en la densidad poblacional de *Escherichia coli* asociada a la mucosa del íleon (Martinez-Medina et al., 2006) y colon (Martinez-Medina et al., 2009). Se ha descrito que un componente de este tipo bacteriano, el Lipopolisacárido (LPS), molécula glicoproteica de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, puede favorecer los procesos de angiogénesis, invasión y metástasis del cáncer (Ikebe et al., 2009; Yang et al., 2014). Referente a la expresión de LOX-1, se ha

observado que los LPS inducen un aumento en su expresión en monocitos y células endoteliales (Zhao, Ma, y Chen, 2014). Sin embargo, existen pocos trabajos dedicados al estudio del efecto de los LPS sobre la expresión de LOX-1 en células tumorales.

La obesidad y las EII son factores de riesgos comunes para el desarrollo del CCR, sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la relación de estas patologías con la activación de LOX-1 y la progresión del CCR. Ante este problema, en el presente trabajo proponemos que uno de los mecanismos que estimula la progresión tumoral del CCR podría estar mediada por la sobreexpresión de LOX-1 inducida por LPS bacteriano, y su activación con LDLox. Esperamos que este podría ser uno de los mecanismos implicados en el proceso, que pudiese explicar por qué existe un mayor riesgo de desarrollar CCR en personas que padecen de obesidad, dislipidemias o EII.

1.2 Características generales del cáncer, migración, invasión y metástasis en CCR.

A pesar de la heterogeneidad clínica de los distintos tipos de cáncer, es posible identificar ciertas características comunes de las células tumorales que permiten entender mejor esta patología (Sánchez, 2013). Se han descrito hasta la fecha, ocho características compartidas por las células tumorales, entre las que se encuentran: la independencia de señales de crecimiento, angiogénesis

sostenida, insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento, invasividad y metástasis, evasión de la apoptosis, potencial ilimitado de replicación, reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune. Estas características son adquiridas en los distintos tipos celulares mediante varios mecanismos y eventos durante el proceso de carcinogénesis favorecido por la inestabilidad genómica y procesos inflamatorios (Curtin et al., 2010; Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011).

Respecto a la invasión y la metástasis en los tumores primarios, solo algunas células adquieren mutaciones que les permiten desarrollar este potencial. Para que estos procesos puedan ocurrir, las células tumorales deben separarse del tumor primario, migrar, entrar al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos, diseminarse por el organismo y establecerse en un órgano distante al de origen (Eger y Mikulits, 2005; Zijl, Krupitza, y Mikulits, 2011). En este proceso, una de las características adquiridas por las células tumorales es la disminución en la expresión de E-cadherina, proteína encargada de la adhesión célula-célula. Esto significa que las células tumorales con capacidad invasiva cambian su fenotipo haciéndose más parecidas a células mesenquimales, en un proceso denominado transición epitelio-mesenquimal (TEM) (Eger y Mikulits, 2005). Está reportado que la expresión de E-cadherina disminuye en tumores epiteliales de mal pronóstico (Baranwal y Alahari, 2009). En este proceso, las células al perder sus uniones adherentes, cambian su morfología epitelial y aumentan la expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular (MEC) beneficiando

su motilidad y favoreciendo el proceso de invasión (Sánchez, 2013). De acuerdo a esto, la TEM se correlaciona inversamente con el pronóstico clínico y es altamente significativa para la progresión del cáncer, incluyendo al CCR (Iwatsuki et al., 2010).

Tanto la adhesión celular como los eventos de señalización están mediados por componentes del complejo cadherina-catenina. Se ha demostrado que la pérdida de expresión de los componentes de este complejo se correlaciona con el comportamiento invasivo en muchos tipos de tumores (Hugh et al., 1999).

La vimentina, por otro lado, una proteína de filamento intermedio involucrada en la mantención de la estructura e integridad celular, se expresa preferentemente en células mesenquimales normales y se ha visto que se relaciona estrechamente en los procesos de TEM durante metástasis (Liu et al., 2015). Se ha visto que vimentina se sobreexpresa en células de carcinoma (SW620) en comparación con células de microadenoma (LT97) (Lazarova et al., 2014).

Además, existen enzimas que degradan la MEC y favorecen el proceso de invasión celular y metástasis (Alaseem et al., 2017). Estas enzimas pertenecen a la familia MMP compuesta por más de 25 endopeptidasas dependientes de zinc y que tienen dominios funcionales comunes, con actividad para degradar prácticamente todos los componentes de la MEC

(colágenos, laminina, fibronectina, vitronectina, enactina y proteoglicanos) (Alaseem et al., 2017).

La MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12, y MMP-13 se sobreexpresan en CCR humano y se correlacionan con el estadio y/o el pronóstico de la enfermedad (Said, Raufman, y Xie, 2014). Por ejemplo, MMP-7 se produce abundantemente por células de CCR y se correlaciona con la proliferación, invasión y metástasis (Sun et al., 2015), mientras que MMP-13 se correlaciona con un mal pronóstico (Said, Raufman, y Xie, 2014). Además, los niveles de expresión de MMP-9 (producidos principalmente por células inflamatorias) están relacionados con metástasis y se ha visto que aumentan al principio de la transición de adenoma de colon a adenocarcinoma (Said, Raufman, y Xie, 2014).

1.3 Tumores colorrectales, clasificación, detección y tratamiento.

Al igual que la mayoría de los tumores malignos, el CCR es una enfermedad extremadamente heterogénea, dicho de otra manera, puede caracterizarse por la presencia de tumores en etapas tempranas quirúrgicamente curables hasta tumores metastásicos altamente letales (D'Angelica, 2013). Debido a esta característica de los tumores colorrectales, es que se hace necesario clasificarlos de acuerdo a algún parámetro medible, con el objetivo de facilitar la elección del tratamiento. En el año 1932 Cuthbert Esquire Dukes publicó un artículo sobre la estadificación del cáncer de recto (Dukes, 1932). Este sistema

también es aplicable al CCR y clasifica a los tumores de acuerdo a su grado de propagación o nivel de invasión en tres estadios o grados: A, B y C. En el estadio A los tumores se limitan a la pared rectal, en el estadio B el tumor difunde a tejidos extra-rectales, y en el estadio C los tumores infiltran a los ganglios linfáticos (Dukes, 1932). Más adelante, se incluyó el estadio D referido a metástasis a distancia (Haq et al., 2009). Por otro lado, uno de los métodos de clasificación más utilizados es el sistema de estadificación TNM (Tumor primario (T); ganglios linfáticos regionales (N); metástasis distante (M)) desarrollado por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC) (Edge y Compton, 2010). Similar al sistema de estadificación de Duke, éste clasifica al CCR en 3 etapas según su nivel de invasión local (etapa T), infiltración a los ganglios linfáticos (etapa N) y presencia de metástasis a distancia (etapa M) (Información más detallada en Anexos).

Para la detección de los tumores colorrectales, el test de hemorragia oculta en deposiciones es una alternativa de tamizaje a nivel poblacional. Se ha demostrado que un tamizaje bianual en adultos mayores de 45 años disminuye en un 16% la mortalidad por CCR (Hewitson et al., 2008). Sin embargo, al ser un cuadro clínico inespecífico, para pacientes sintomáticos, el examen a elección es la colonoscopia larga en conjunto con la toma de una biopsia (Minsal, 2013).

La resección quirúrgica y la quimioterapia adyuvante de los tumores primarios es el tratamiento a elección y se hace en referencia a la clasificación TNM, no obstante, se ha documentado que alrededor del 30% de los pacientes con CCR de estadio III y el 10% en estadio I / II pueden desarrollar recurrencia local o metástasis en 5 años posteriores a la cirugía (Hsu et al., 2011). Es por este motivo que el CCR sigue manteniéndose dentro de los tumores primarios más frecuentes a nivel mundial.

1.4 Etiología y factores de riesgo en CCR.

La etiología exacta del CCR aún es desconocida, sin embargo, su origen multifactorial ha relacionado a factores genéticos, epigenéticos y ambientales en su desarrollo. La acumulación de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas (Grady y Carethers, 2008) producen la transformación y proliferación de células del epitelio colónico normal a células cancerígenas (Dulal y Keku, 2014). Algunas de las alteraciones descritas a nivel celular involucradas en su desarrollo son: la activación del oncogen *K-ras* (Fearon y Vogelstein, 1990), mutaciones en el gen *APC* (adenomatous polyposis coli) (Nakamura et al., 1992), la inactivación de genes supresores de tumores como *p53* (codificada por el gen *TP53* en humano) (White, 1998), inestabilidad de microsatélites y metilaciones en las islas CpG (Arends, 2013)

En cuanto a los factores de riesgo ambientales involucrados en el desarrollo del CCR se han clasificado en dos categorías: modificables y no modificables (García et al., 2011). Entre los factores de riesgo modificables destaca: la dieta rica en grasas, consumo de carnes rojas y alimentos procesados, inactividad física, consumo de alcohol y tabaco, obesidad, síndrome metabólico, entre otros (García et al., 2011; Johnson et al., 2013; Moghaddam, Woodward, y Huxley, 2007; Song, Garrett, y Chan, 2015).

La obesidad se reconoce como un factor de riesgo para el CCR y se estima que alrededor de un 20% de los cánceres esporádicos se deben a ello (Moghaddam, Woodward, y Huxley, 2007). Estudios epidemiológicos en países desarrollados, apoyan la teoría que asocia a la obesidad con el desarrollo de varios tipos de neoplasias como el cáncer de mama, colon, riñón, endometrio y esófago (Zhang, Wu, y Yu, 2016). La obesidad genera un estado de inflamación crónica de bajo grado que se caracteriza por una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Esser et al., 2014; Gregor y Hotamisligil, 2011; Liu et al., 2012), que participan en el inicio, desarrollo y progresión del CCR mediante la estimulación constante de las vías de señalización intracelular que promueven la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ERDOs), daño al ADN, la proliferación celular, migración y angiogénesis (West et al., 2015). Otros factores relacionados con la obesidad están involucrados en los procesos asociados al cáncer: la lipoproteína de baja densidad oxidada y su principal receptor, LOX-1 (Khaidakov y Mehta, 2011). Se

ha demostrado una relación entre los niveles plasmáticos de LDLox con el riesgo de desarrollar CCR (Suzuki et al., 2004). A su vez, otras evidencias demuestran como en pacientes con cáncer de mama y ovario, los niveles de esta lipoproteína se encuentran casi 4 y 5 veces aumentados con respecto a sujetos sanos (Delimaris et al., 2007).

Las dislipidemias (triglicéridos \geq 150 mg/dL; colesterol total \geq 200 mg/dL; colesterol LDL \geq 150 mg/dL; colesterol HDL \leq 40 mg/dL) también se han relacionado con un mayor riesgo en el desarrollo de CCR (Yao y Tian, 2014). Por el contrario, las altas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL) en suero reduce los riesgos de desarrollar cáncer de colon (Duijnhoven et al., 2011).

Referente a los factores de riesgo no modificables éstos incluyen: la edad, un historial familiar de CCR de primer grado (antes de los 60 años de edad) (Minsal, 2013), síndrome de Lynch y PAF (Al-Sukhni, Aronson, y Gallinger, 2008) y antecedente de EII (Terzić et al., 2010). Ambos, el síndrome de Lynch y la PAF son enfermedades hereditarias autosómicas dominantes poco comunes, la primera es responsable del 3 al 4 % de todos los CCR a temprana edad y no se origina a partir de pólipos adenomatosos, mientras que PAF ocurre entre los 5 a 40 años de edad y se caracteriza por la presencia de pólipos adenomatosos colónicos que podrían desencadenar en neoplasias (Al-Sukhni, Aronson, y Gallinger, 2008).

Las EII se asocian con un aumento sustancial en el riesgo de CCR, lo que se incrementa potencialmente después de 8 a 10 años del curso de estos trastornos (Terzić et al., 2010). En estos pacientes, la inflamación actuaría como un promotor de la tumorigénesis asociado a la infiltración de células inflamatorias del sistema inmune y un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Terzić et al., 2010). Con respecto a los mecanismos relacionados a estos trastornos se incluye: la activación constante de las vías de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), del factor nuclear kappa-B (NF- κ B) y un aumento del estrés oxidativo (O'Connor et al., 2010), vinculados a un cuadro de inflamación crónica (Danese y Mantovani, 2010). Se ha descrito previamente que la modulación de genes relacionados a vías inflamatorias o el uso regular de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) pueden modular el riesgo de desarrollar CCR (Curtin et al., 2010; Ruder et al., 2011). Todos estos antecedentes estarían poniendo en evidencia como la inflamación está implicada en la progresión de la enfermedad.

1.5 EII, microbiota y su relación con CCR.

Las EII como la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU) son trastornos inflamatorios crónicos del tracto gastrointestinal de etiología aún desconocida (Mayer, 2010). Para individuos genéticamente susceptibles (Bauer, 2014), una de las hipótesis más aceptadas sobre la patogénesis de las

EII tiene que ver con la desregulación de la respuesta inmune frente a microorganismos comensales, que en consecuencia generan un daño en el epitelio de la mucosa gastrointestinal (Jostins et al., 2012; Mayer, 2010). Esta respuesta inmune alterada estaría mediada por las células T helper 17, responsables de una respuesta inflamatoria exacerbada (Kanauchi, Mitsuyama, y Andoh, 2013; Sobhani et al., 2011). Además, se considera que la composición global de la microbiota intestinal, es relevante en la etiología y patogenicidad de las EII (Sartor, 2008). Existen estudios que demuestran como la composición microbiana colónica en estos pacientes se encuentra alterada y es distinta a la de sujetos sanos (Andoh et al., 2011). Esta alteración en la distribución de la microbiota consta específicamente de una disminución en la densidad bacteriana perteneciente a los phylum Bacteroidete y Firmicutes como *Faecalibacterium prausnitzii* y un aumento en la fracción de Proteobacteria como *Escherichia coli* (Andoh et al., 2011; Morgan et al., 2012; Sokol et al., 2008). En pacientes con enfermedad de Crohn y en menor frecuencia en colitis ulcerativa, poseen un aumento en la densidad poblacional de *Escherichia coli* asociada a la mucosa del íleon (Martinez-Medina et al., 2006) y colon (Martinez-Medina et al., 2009). Estos últimos antecedentes pueden apoyarse en estudios *in vitro* realizados en células epiteliales intestinales donde esta población bacteriana expresa un componente proteico denominado hemaglutinina que se correlaciona con la habilidad de adhesión e invasión de los microorganismos en las células del epitelio intestinal (Prorok-Hamon et al., 2014).

Correspondiente a la relación entre EII y CCR, las alteraciones en la diversidad de la microbiota intestinal y modificaciones en la respuesta inmune, podrían ser la causa del desarrollo de este cáncer (Sobhani et al., 2011). Es más, se ha descrito que pacientes que padecen EC tienen un riesgo de un 2,9% mayor de desarrollar tumores después de 10 años de su diagnóstico, con respecto a la población en general (Canavan, Abrams, y Mayberry, 2006; Rutter, 2004). Así mismo, la edad de inicio de los tumores colorrectales asociados a colitis es generalmente menor (edad promedio entre 50 y 60 años) en comparación con los cáncer esporádicos en pacientes sin un antecedente previo de EII (edad promedio de 65 a 75 años) (Baars et al., 2012).

En un modelo de ratón libres de gérmenes se demostró cómo un solo tipo bacteriano (*Bacteroides vulgatus*) puede inducir no sólo un estado inflamatorio del colon, sino también causar multiplicidad de tumores. De esta manera, la presencia bacteriana en este modelo es necesaria para desarrollar un cuadro inflamatorio crónico con inducción de la tumorigénesis (Uronis et al., 2009).

Sumado a todos estos antecedentes, se ha descrito que el LPS induce una respuesta inflamatoria y altera la respuesta inmune (Aldapa-Vega et al., 2016). En monocitos periféricos de pacientes con EC previamente estimulados con LPS se induce la secreción de varias citoquinas pro-inflamatorias entre las cuales se encontraron: TNF- α , IL-6, y IL-1 β (Hew et al., 2006; Knutson et al., 2013; Mazlam y Hodgson, 1992). Paralelamente, y al igual que una variedad de componentes bacterianos su reconocimiento en células epiteliales intestinales y

macrófagos es mediado a través de “motivos”, con el fin de discriminar entre microorganismos patógenos y comensales. Este proceso se lleva a cabo mediante la activación de receptores tipo toll (TLRs) o receptores de la familia-NOD (NLR) (Elinav et al., 2011). Eventualmente, se describe que en pacientes con EII, el receptor tipo Toll-4 (TLR-4) tiene una función específica en la defensa temprana del huésped contra los patógenos invasores, se encuentra altamente distribuido a nivel de la mucosa intestinal (Fukata y Abreu, 2009; Fukata, Vamadevan, y Abreu, 2009).

1.6 Relación entre obesidad, estrés oxidativo y niveles de LDLox en cáncer.

Estudios más detallados revelan que el 9% de los casos de cáncer de mama postmenopáusico, 39% de las causas de cáncer de endometrio, el 25% de los casos de cáncer de riñón, el 37% de cáncer de esófago y el 11% de los casos de CCR pueden ser atribuibles a la obesidad (Handbooks y Prevention, 2002). Se han descrito varios mecanismos que relacionan a la obesidad con la iniciación y progresión del cáncer, entre los que destacan: las interacciones paracrinas entre células epiteliales y adipocitos, alteraciones en la señalización de la insulina y la conversión de andrógenos en estrógenos en mujeres posmenopáusicas (Calle y Thun, 2004; Kelesidis, Kelesidis, y Mantzoros, 2006; Lorincz y Sukumar, 2006), sin embargo, existen otros mecanismos moleculares

que podrían estar involucrados, como la activación del receptor LOX-1 por LDLox (Khaidakov y Mehta, 2011).

La LDL es una de los siete tipos de lipoproteínas que se definen como moléculas compuestas de proteínas y lípidos encargadas de trasladar el colesterol y otras sustancias a través de la sangre. Entre ellas: los quilomicrones, restos de quilomicrones, VLDL, IDL, LDL, HDL y Lp (a). Son partículas complejas, con un núcleo central que contiene ésteres de colesterol y triglicéridos rodeados por colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas, que facilitan la formación y el funcionamiento de las lipoproteínas. La fracción de LDL es captada mediante el receptor de LDL en numerosos tejidos, sobre todo en el hígado (Vance y Vance, 2008). Es conocido que los niveles séricos de colesterol LDL en sujetos obesos se encuentran elevados. Al mismo tiempo, se cree que el aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno en estos sujetos conducirían a la conversión de LDL en LDLox (Pischon, Nöthlings, y Boeing, 2008; Suzuki et al., 2004).

Respecto a pacientes con pólipos colorrectales, un estudio demostró cómo los niveles de LDLox en plasma de estos pacientes se encuentran aumentados con respecto a sujetos sanos, y como sus niveles de antioxidantes en plasma como β -caroteno y vitamina A disminuirían en estos y más aún en pacientes con CCR. Este mismo suceso estaría ocurriendo con los niveles de estrés

oxidativo en sangre a medida que avanza la etapa tumoral (Crespo-Sanjuán et al., 2015).

Basado en estos precedentes, se considera que los niveles aumentados de LDLox promueven su unión al receptor LOX-1 y subsecuentemente su internalización en diferentes tipos celulares, incluyendo células tumorales (Aoyama et al., 1999). Asimismo, este proceso favorecería la generación de especies reactivas del oxígeno, con una retroalimentación positiva con LOX-1 (Lu et al., 2011).

Dado el impacto de la obesidad en la incidencia y progresión de varios tipos de cáncer, resulta de suma importancia el estudio más detallado de los mecanismos relacionados entre la obesidad y el desarrollo del cáncer.

1.7 LOX-1 y su relación con CCR.

LOX-1 es una glicoproteína de membrana tipo II de un tamaño de 32 kDa, codificada por el gen *OLR-1*, con una estructura perteneciente a la familia de las lectinas tipo C y miembro de la familia de receptores “*scavenger*” (Yamada et al., 1998). Es un mediador en el reconocimiento e internalización de LDLox (Sawamura et al., 1997), y contiene cuatro dominios: un dominio corto citoplasmático N-terminal, un dominio transmembrana, un dominio de cuello y un dominio C-terminal extracelular tipo lectina (CTLD) (Falconi et al., 2007; Ohki et al., 2005; Park, Adsit, y Boyington, 2005). Este último interactúa con LDLox,

formando un homodímero unido mediante enlaces disulfuro, que se ensambla en oligómeros funcionales más grandes a través de interacciones no covalentes (Biocca et al., 2008; Cao et al., 2009; Ohki et al., 2011). LOX-1 se expresa preferentemente en células endoteliales y se sobreexpresa en los tejidos del ateroma mediando los procesos de disfunción endotelial vascular, inflamación, formación de las células de espuma y regulando el metabolismo del colesterol en adipocitos (Aldapa-Vega et al., 2016; Condamine et al., 2016; Li et al., 2015; Parlato et al., 2010; Xu et al., 2012). Pese a las evidencias que relacionan a LOX-1 con los procesos ateroscleróticos, otros estudios demuestran que LOX-1 también participaría en la progresión de varios tipos de cáncer (Khaidakov y Mehta, 2011). Estudios preliminares de nuestro laboratorio, demostraron que en líneas celulares de cáncer de próstata, la activación de LOX-1 por su ligando LDLox, promueve procesos de proliferación celular, angiogénesis (expresión de moléculas pro-angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)) y migración e invasión (aumento de expresión y actividad de metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9) (González-Chavarría et al., 2014). En otras investigaciones también se ha observado como bajas concentraciones de LDLox promueve la expresión de VEGF (Dandapat et al., 2007; Hu, Dandapat, y Mehta, 2007), correlacionado con el aumento en el recuento de microvasos, la progresión tumoral y la metástasis (Miller, Isenberg, y Roberts, 2009). En líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231), se identificó que la expresión de moléculas proinflamatorias como el factor de

necrosis tumoral α (TNF- α), un estado de hiperglicemia o la participación de endotoxinas, podrían regular la expresión de LOX-1 alterando los procesos de adhesión celular y favoreciendo la migración transendotelial en la progresión tumoral (Liang, Zhang, y Fu, 2007). Además, la sobreexpresión de LOX-1 por estos mismos mediadores favorece la expresión de moléculas de adhesión celular y quimioquinas como I-CAM, V-CAM, P-selectina, y MCP-1 necesarias para la migración transendotelial y metástasis (Mehta et al., 2006).

En cuanto a los tumores colorrectales la inhibición en la producción de colesterol por estatinas genera un efecto protector contra la carcinogénesis (Poynter et al., 2005). Este último antecedente puede respaldarse con la evidencia que en pacientes con enfermedad coronaria recién diagnosticada la prevalencia de CCR es mayor que en pacientes con antecedentes previos y tratamiento con estatinas (Chan et al., 2007).

En lo que concierne a la expresión de LOX-1 en CCR, se ha demostrado que en tumores humanos existe incremento en la expresión de este receptor, con un aumento de un 72 % en carcinomas y de hasta un 90% en tumores altamente agresivos y metastásicos comparado con la mucosa colónica normal (Murdocca et al., 2016). Por el contrario, el silenciamiento de LOX-1 disminuye la proliferación y migración celular en líneas de CCR. Sorpresivamente, los niveles de LOX-1 también se encuentran elevados en adenomas, lo que sugiere que este receptor estaría modulando a los tumores desde sus etapas iniciales (Murdocca et al., 2016). Sumados a todos los antecedentes recopilados,

postulamos que LOX-1 es un receptor importante en la progresión de varios tipos de cáncer, incluyendo al CCR.

1.8 Efecto del Lipopolisacárido bacteriano sobre la progresión tumoral y su relación con la expresión de LOX-1.

En base a evidencias que demuestran que compuestos bacterianos implicados en la respuesta inflamatoria crónica, como el LPS, promueven la activación de *NF- κ B* en líneas celulares tumorales humanas (Kojima et al., 2000; Nakashima et al., 2006), es que se hace necesario estudiar a fondo los mecanismos celulares relacionados con la inducción de los procesos inflamatorios asociados a LPS con el cáncer colorrectal. Relacionado a lo anterior, el LPS aumenta el potencial de invasión en células de cáncer de páncreas, lo que sugiere una estrecha conexión entre inflamación y los procesos de invasión y progresión de diferentes tipos de cáncer (Ikebe et al., 2009). Además, la estimulación con LPS induce la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9) y del factor de crecimiento endotelial vascular en líneas celulares de cáncer de mama humano (MDA-MB-23). Al mismo tiempo, este estímulo produce un aumento en la invasión y en la secreción de IL-6 e IL-10 en estas células. Además, en estudios *in vivo*, se demostró que la estimulación con LPS aumenta la tumorigénesis y la cantidad de lesiones metastásicas en hígado de ratones *nude*, lo que indica que también

estaría participando en la progresión y metástasis del cáncer de mama humano (Yang et al., 2014).

En el caso del CCR, debido a que las bacterias colónicas ubicuas aportan LPS al entorno, se ha identificado que esta endotoxina aumenta su potencial metastásico mediante la activación en la expresión de TLR4 (Simiantonaki et al., 2007), la cual se hace significativa en células que expresan niveles bajos del receptor (como la línea celular CaCo2), mientras que en células que expresan cantidades relativamente altas de TLR4 no se observa una respuesta significativa a LPS, lo que sugiere que la expresión de TLR4 puede estar asociada a mecanismos relacionados a la progresión del CCR (Simiantonaki et al., 2007). Además, LPS incrementa el potencial de metástasis en dos líneas celulares de cáncer de colon (C26 y HCT116), y potencia la migración, favoreciendo un fenotipo de transición epitelio-mesenquimal de manera dependiente de TLR4 (Ying et al., 2018).

También es conocido que LPS produce un aumento en la expresión de LOX-1 en monocitos y células endoteliales (Zhao, Ma, y Chen, 2014). El mecanismo por el cual se regula la expresión de LOX-1 ha sido descrito en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), donde se observó que un estímulo con LPS produce una sobrerregulación de los niveles de expresión de las vías p38/MAPK y p65 mediante la activación de TLR-4 (Zhao, Ma, y Chen, 2014). De hecho, el silenciamiento de este receptor a través de

siRNA se relacionó con una disminución en la expresión de LOX-1 (Zhao, Ma, y Chen, 2014). A su vez, se ha observado el mismo efecto sobre la expresión de LOX-1, al silenciar MyD88 y Nox4, o al utilizar inhibidores para las vías p38/MAPK, NF- κ B, ciclooxigenasa-2, y NADPH oxidasa (Pang et al., 2012; Zhao, Ma, y Chen, 2014). Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de regulación de la expresión de LOX-1 es mediado por la activación del receptor TLR-4, y además por una vía de señalización dependiente de MyD88 y de la producción de ERDOs a través de la enzima NADPH oxidasa. Esta enzima activa la vía p38MAPK y la translocación de NF- κ B al núcleo en células endoteliales (Zhao, Ma, y Chen, 2014). Este mismo mecanismo podría aplicarse a células cancerígenas, ya que en líneas celulares de cáncer de colon (SW480) estimuladas con LPS aumenta en la fosforilación de la proteína p65, se incrementa la actividad de NF κ B y la producción de IL-1 β y IL-6, lo que favorece la migración e invasión de este tipo celular (Rakhesh et al., 2012).

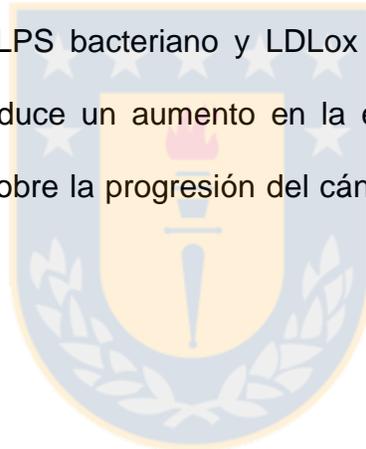
2 PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Problema.

Se desconoce la relación funcional del receptor LOX-1 con la progresión del cáncer colorrectal humano.

2.2 Pregunta.

¿El estímulo con LPS bacteriano y LDLox en líneas celulares de cáncer colorrectal humano induce un aumento en la expresión del receptor LOX-1?
¿Cómo esto influiría sobre la progresión del cáncer colorrectal en un estudio *in vitro*?



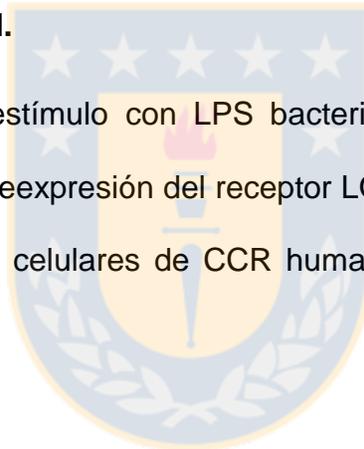
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis.

El lipopolisacárido bacteriano de *Escherichia coli* (cepa 055:B5) estimula la sobreexpresión del receptor LOX-1 e induce la progresión tumoral en líneas celulares de cáncer colorrectal humano, mediado por la activación con LDLox.

3.2 Objetivo general.

Evaluar si un estímulo con LPS bacteriano de *Escherichia coli* (cepa 055:B5) induce la sobreexpresión del receptor LOX-1, y promueve la progresión tumoral en tres líneas celulares de CCR humano cuando son co-estimulados con LDLox.



3.3 Objetivos específicos.

1.- Analizar el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de LPS y LDLox en las líneas celulares de CCR (COLO320, HCT116 y SW620) y seleccionar las condiciones de trabajo específicas (concentración del estímulo).

2.- Determinar la concentración de estímulo de LPS bacteriano y LDL oxidada a la cual se observa la máxima expresión de *OLR-1/LOX-1*, sin efecto citotóxico.

3.- Analizar la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquimal (Vimentina, E-cadherina, Plakoglobina), y actividad de metaloproteinasas de matriz (MPP-2 y MPP-9) en las tres líneas celulares de CCR tratadas con las concentraciones previamente determinadas de LPS bacteriano y LDLox.

4.- Evaluar el efecto de LPS bacteriano y LDLox en la migración e invasión de líneas celulares de CCR humano mediante ensayos funcionales de migración e invasión en *transwell*.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 MATERIALES.

4.1.1 Material biológico.

En este trabajo se utilizaron tres líneas celulares de CCR humano COLO320 (ATCC; CCL-220), HCT116 (ATCC; CCL-247) y SW620 (ATCC; CCL-247). Las primeras dos líneas celulares provenientes de un tumor primario de grado Dukes C femenino y D masculino, respectivamente. La línea celular SW620 fue aislada de un tumor metastásico en linfonodo masculino y tiene grado Dukes C. Además, se utilizaron las líneas celulares CHO (ATCC; CCL-61) y HEK (LOX+); esta última generada en nuestro laboratorio a partir de la línea celular HEK293FT que sobreexpresa el receptor LOX-1.

4.1.2 Reactivos y materiales.

AGILENT TECHNOLOGIES: Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Master Mix Step, tampón de carga púrpura (6x).

AMBION: Trizol.

AMRESCO: Bis-Acrilamida, persulfato de amonio, TEMED.

BIOLOGICAL INDUSTRIES: BIOMYC-3.

BIORAD: Membrana de nitrocelulosa.

BIORON: Albúmina Bovina (BSA), marcador de peso 100 bp Rainbow extended DNA Ladder.

BIOWEST: Suero bovino fetal.

CALBIOCHEM: B-mercatoetanol, Tween 20.

CHEMCRUZ: Tris Base.

CORNING: Agua grado biología molecular, amphotericina B, soportes permeables Transwell con membrana de policarbonato 8,0 μm .

E.Z.N.A: BUFFER TG 10X.

GENAXXON BIOSCIENCE: Reactivo azul de Tiazolilo bromuro de Tetrazolio (MTT).

GIBCO: Medio de cultivo DMEM + glutamina + piruvato.

HYCLONE: Tripsina 0.25%, L-Glutamina 200mM (100X), Penicilina-Estreptomicina (100X), tripsina 0,25%, medio de cultivo RPMI.

LONZA: Agarosa.

MERCK & CO., INC.: Azul brillante de Coomasie, SDS (Sodium n-Dodecyl sulfato), cloruro de sodio, hidróxido de sodio, etanol absoluto, cloruro de calcio, azida de sodio, paraformaldehído, Tritón X-100, Dimetil Sulfóxido (DMSO).

MILLIPORE: Filtros de 0,22 μm y de 0,45 μm .

Maestrogen: Marcador de peso preteñido para proteínas de amplio rango AccuRuler RGB (11-245 kDa),

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIES: Anticuerpo IgG1 monoclonal anti-E-cadherina (sc-8426) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; anticuerpo IgG1 monoclonal anti-GAPDH (sc-47724) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; anticuerpo IgG1; anticuerpo IgG policlonal de cabra anti-MMP-9 (sc-6841) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; anticuerpo IgG policlonal de conejo anti-MMP-2 (sc-10736) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; anticuerpo IgG1 monoclonal anti-vimentina (sc-66001) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-TLR4 (sc-10741) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

R&D SYSTEMS INC: anticuerpo IgG policlonal de cabra anti-LOX-1 (AF1798) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

JACKSON: Anticuerpo IgG de burro anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 790 (715-655-150) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Anticuerpo IgG de burro anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 680 (715-625-150) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Anticuerpo IgG de burro anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 790 (711-655-152) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Anticuerpo IgG de burro

anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 680 (711-625-152) 500 µg/mL; Anticuerpo IgG de burro anti-cabra conjugado a Alexa Fluor 790 (705-655-147) 500 µg/mL.

SIGMA-ALDRICH: Solución de Poly-L-lisina, -D-(+)-Glucosa, acrilamida, gelatina, Triton X-100, RPMI + L-glutamina bicarbonato.

THERMO SCIENTIFIC: Inhibidor de proteasas 100X, azul de coomassie, tampón RIPA, EDTA, Reactivos para cuantificación de proteínas BCA™, tubos Sorvall para ultracentrífuga.

WINKLER: Cobre II Sulfato 5-Hidrato, cloroformo, buffer TAE 50X, rojo ponceau, EDTA sal disodica 2-HID, ácido clorhídrico 37%, bromuro de etidio 100 mg/mL, agua DEPC, Tween-20, PBS.

4.1.3 Equipos e instrumentos.

Licor Odyssey CLX, PCR en tiempo real Agilent Technologies Ariamx real-time PCR system; lector de microplacas Synergy/HTX multi-mode reader Biotek, vórtex mixers (VM-10); agitador Wise Shake (Sho-1D); placa térmica digital Block Heater select Bio Products; placa UV UVITEC Cambridge Uvisage HD2; Balanzas analítica Mettler Toledo (AT261 y PG2002-S); pHmetro Marova Laboratorio (920); cabina de seguridad biológica clase II (modelo NU425400E); incubadora de líneas celulares (AutoFlow 5500 incubator); cabina estación de PCR Airclean 600 PCR (modelo 300); destilador POBEL (modelo 710); micropipetas Axygen; horno microondas Electrolux, autoclave Wiseclave;

centrífuga Eppendorf (modelo 5702); refrigerador Glacier Nuaire (modelo NU9483E); centrífuga Mikro 220R Heltich zentrifugen (modelo D78532); baño termorregulado WiseBath; microscopio Olympus (modelo IX81); microscopio invertido Motic (AE31); sistema de transferencia semidry Trans-Blot Turbo BioRad; fuente de poder Electrophoresis Power Supply Consort (modelo EV202); cámara de Neubauer para conteo celular HBG.

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 Cultivo de líneas celulares.

Tres líneas celulares de CCR humano (COLO320, HCT116 y SW620) se cultivaron en frascos de cultivo T75 en medio DMEM (para las líneas celulares SW620 y HCT116) y RPMI (para la línea celular COLO320), suplementados con suero bovino fetal (SBF) al 10 % y bajo condiciones estándares de cultivo (5 % de CO₂ a 37°C). Para el cultivo de las células en placas de tratamiento, se les retiró el medio de cultivo por aspiración y la monocapa celular se lavó con solución tampón de fosfato (PBS) y se incubó con tripsina (0,05 % en EDTA 0,1 %) a 37° C, tras lo cual las células se despegaron de la superficie de la placa. La tripsina fue neutralizada con medio de cultivo completo. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 150 g por 10 minutos, y el sedimento celular fue resuspendido en medio fresco y a la densidad requerida para los ensayos.

4.2.2 Obtención y oxidación de la LDL.

La LDL se obtuvo a partir de 100 mL de sangre de 4-5 voluntarios sanos normolipémicos que previamente leyeron y firmaron un consentimiento informado para la recolección de sangre, adjunto en el Anexo (8.1). La obtención final de LDL de las muestras de suero de pacientes se llevó a cabo por ultracentrifugación secuencial a 38.000 x g durante 20 horas a 15°C. La fracción de LDL fue dializada en solución tampón fosfato por 24 horas y cuantificada por el método de BCA. La LDL se diluyó a una concentración de 1 mg/mL y se oxidó con 10 μ M de CuSO_4 . Luego de 3 horas, se paró la reacción de oxidación mediante la adición de BHT como antioxidante y EDTA como agente quelante de iones Cu^{2+} , dializándose en las mismas condiciones anteriores durante 24 horas. La muestra dializada fue filtrada en membrana de 0,45 μ m y se almacenó a 4°C protegida de la luz. La oxidación de la LDL se monitoreó mediante la detección por espectrofotometría a 243 nm de la formación de dienos conjugados, por ensayo de detección de especies reactivas del ácido tiobarbitúico (TBARs), y electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/V) seguido de tinción con azul de Coomassie (Figura 1).

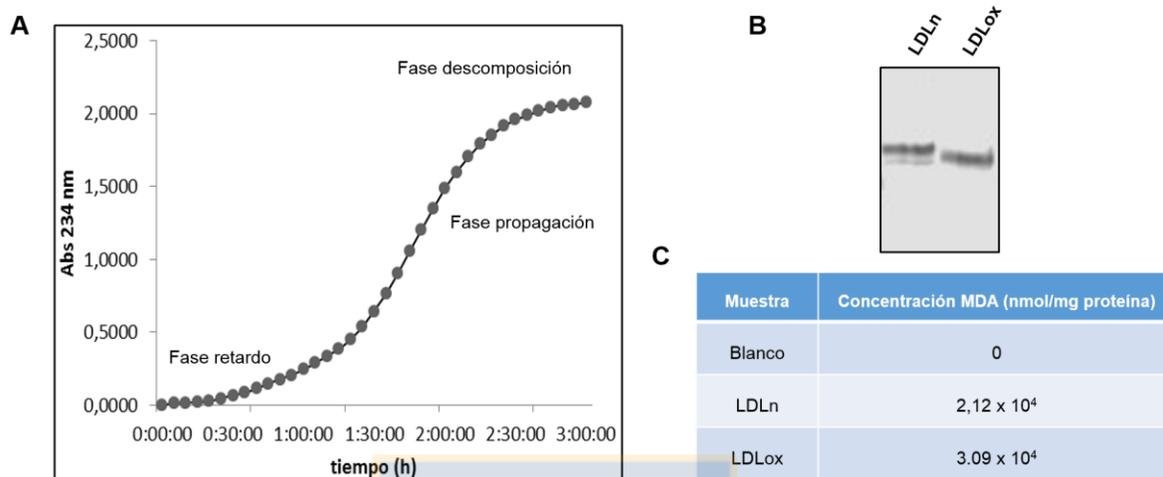


Figura 1. Oxidación de LDL a partir de plasma humano. La fracción LDL obtenida de plasma de donantes sanos normolipémicos se oxidó con 10 mM de CuSO_4 y fue (A) monitoreada por espectrofotometría a 243 nm, además, (B) se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% con tampón de borato de sodio. Por último, (C) se midió la concentración de malondialdehído (MDA) producto del proceso de lipoperoxidación. (Fuente: Elaboración propia).

4.2.3 Recuento de células en cultivo.

Con las mismas condiciones de cultivo establecidas en el punto 5.2.1, se tomó una alícuota de células y se mezcló con azul de Tripán (dilución 1:4) para el recuento en cámara de Neubauer. Para calcular el número de células/mL de acuerdo a la dilución, se utilizó la siguiente fórmula: Σ (número de células en los 4 cuadrantes) $\times 10^4$ = número de células/mL.

4.2.4 Tratamientos con LPS y LDL oxidada.

Las células cultivadas en placas de ensayo fueron tratadas con distintas concentraciones de LPS (0-10 µg/mL) (sc-221855^a, Santa Cruz) y LDL oxidada (0-150 µg/mL) en medio con SBF al 2% en un tiempo de incubación de 24 y 48 horas para los ensayos de proliferación celular y de expresión de LOX-1. Para los ensayos de cotratamiento las células fueron tratadas previamente a una concentración fija de LPS (5 µg/mL) por 24 horas y luego fueron tratadas con 25 y 50 µg/mL de LDLox para COLO320, 50 y 100 µg/mL de LDLox para HCT116 y SW620, y 5 µg/mL de LPS por 48 horas.

4.2.5 Ensayos de viabilidad celular por reducción de sales de *Tetrazolio*.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular, las células (COLO320, HCT116 y SW620) fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en medio DMEM y RPMI suplementado con SBF 10% y en condiciones de cultivo estándar por 24 horas. Las células fueron tratadas 24 horas más tarde con LPS y LDL oxidada de acuerdo al protocolo 4.2.4. Luego, se incubó con la solución de MTT (5 mg/ml) en medio basal por 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo, el medio fue aspirado de la capa celular. Los cristales de formazán formados fueron liberados al lisar las células con isopropanol. Se midió la absorbancia a 570/630 nm con un lector de microplaca. Los valores obtenidos fueron expresados como porcentaje relativos (%) al control (células sin tratar).

4.2.6 Extracción y cuantificación de proteínas totales.

Para la extracción de proteínas totales, las células (COLO320, HCT116 y SW620) previamente tratadas fueron lisadas en frío con 120 μL de tampón RIPA combinado con un inhibidor de proteasas, por 5 minutos. Luego se raspó vigorosamente la superficie del pocillo y las muestras fueron dispensadas en tubos Eppendorf de 1,5 mL, para su sonicación, centrifugación (14000 rpm por 15 minutos) y obtención del sobrenadante que se almacenó a -80°C . Para la cuantificación de proteínas totales, se preparó previamente una curva de calibración con concentraciones crecientes de Albúmina sérica de bovino (BSA) (0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). En una placa de 96 pocillos, se agregó un volumen de 10 μL de muestra o de la curva de calibración y se mezcló con 200 μL del reactivo BCA; según instrucciones del fabricante. Se incubó la placa por 30 minutos a 37°C . Pasado el tiempo de incubación, se realizó la lectura de valores de absorbancia en lector de microplaca a una longitud de onda de 562 nm. A partir de la curva de calibración, se realizaron los cálculos de concentración de proteínas de las muestras obtenidas.

4.2.7 Separación de proteínas mediante SDS-PAGE y western blot.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% (protocolos estandarizados del laboratorio) y se colocaron en cámara electroforética con tampón de corrida (16% Tris Base, 78% glicina y 5% SDS; pH 8.3). Ya montados los geles en la cámara electroforética, se cargó una cantidad fija de proteína (40-50 μg en tampón de carga 6X

con β -mercaptoetanol) por pocillo, además se le adicionó un estándar de proteínas como medio de referencia. Luego, se inició la separación de las proteínas (100 mV; 300 mA; 2 horas). La transferencia se hizo en membranas de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia semidry (25 V, 0,2 mA por 30 minutos). Las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada a temperatura ambiente por 1 hora. Las membranas fueron lavadas con solución de lavado (PBS y 0,1% de Tween 20) e incubadas con el anticuerpo primario (Tabla 1), toda la noche. Al día siguiente, éstas fueron lavadas con solución de lavado e incubadas con anticuerpo secundario fluorescente (Tabla 2) por una hora, cuidándolas de la exposición a la luz. Por último, se reveló en el equipo ODYSSEY CLx, con el programa mageStudio. El análisis de intensidad de banda fue hecho con el programa Image J 4.9.



Tabla 1. Anticuerpos primarios para inmunodetección.

Anticuerpo	Tipo	Proveedor	Código	Concentración	Dilución
E-cadherina	Monoclonal de ratón	Santa Cruz	sc-8426	200 ug/ml	1/1000
GAPDH	Monoclonal de ratón	Santa Cruz	sc-47724	200 ug/ml	1/4000
LOX-1	Policlonal de cabra	R&D Systems	AF1798-sp	200 ug/ml	1/3000 *1/100
Vimentina	Monoclonal de ratón	Santa Cruz	sc-66001	200 ug/ml	1/1000
TLR4	Policlonal de conejo	Santa Cruz	sc-10741	200 ug/ml	1/500
Placoglobina	Policlonal de conejo	Santa Cruz	sc-7900	200 ug/ml	1/1000

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Anticuerpos secundarios fluorescentes para inmunodetección.

Anticuerpo	Tipo	Proveedor	Código	Concentración	Dilución
Alexa Fluor 790 Anti-ratón	Burro	Jackson	715-655-150	500 ug/mL	1/5000
Alexa Fluor 680 Anti-ratón	Burro	Jackson	715-625-150	500 ug/mL	1/5000
Alexa Fluor 790 Anti-conejo	Burro	Jackson	711-655-152	500 ug/mL	1/5000
Alexa Fluor 680 Anti-conejo	Burro	Jackson	711-625-152	500 ug/mL	1/5000
Alexa Fluor 790 Anti-cabra	Burro	Jackson	705-655-147	500 ug/mL	1/5000 *1/400

* Diluciones utilizadas de los anticuerpos en inmunofluorescencia.

Fuente: Elaboración propia.

4.2.8 Inmunofluorescencia.

Las células HEKLOX, CHO y las tres líneas celulares de CCR (COLO320, HCT116 y SW620) fueron cultivadas en cubreobjetos circulares a semiconfluencia. Al día siguiente, las células fueron lavadas con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), fijadas con paraformaldehído al 4% y bloqueadas usando 0,1% de Triton X-100 + 1% suero de caballo a 4°C por una hora. Se incubó con el anticuerpo policlonal anti-LOX-1 (R & D Systems Inc.) descrito en la Tabla 1 toda la noche. Se incubó con el anticuerpo secundario IgG de burro anti-cabra conjugado a Alexa Fluor 790, descrito en la Tabla 2 por dos horas. Por último, las células fueron lavadas y teñidas con DAPI. La expresión de LOX-1 fue visualizada usando un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81/DSU).

4.2.9 Purificación de ARN.

La purificación de ARN se hizo a partir de células cultivadas en placas de 12 pocillos. Se purificó ARN total de todas las líneas celulares con TRIZOL, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La integridad del ARN purificado se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/V) en solución tampón Tris-acetato. Las muestras de ARN se cuantificaron mediante espectrofotometría a 260 nm y medida su relación 260/280 para posteriormente ser almacenadas a -80°C para su futuro uso.

4.2.10 Análisis de ARN.

Las muestras de ARN se analizaron mediante RT-PCR cuantitativo y para ello, se utilizó el kit comercial Brilliant III Ultra-fast SYBR Green QRT-PCR siguiendo las instrucciones de los fabricantes y el equipo AriaMx. Las reacciones de transcripción reversa se realizaron de acuerdo a la información entregada en la Tabla 3. Se utilizó como control interno a ROX y como normalizadores el gen de referencia *ACTB*. La amplificación del fragmento esperado se confirmó a través del análisis de las curvas de disociación y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v). Se estudiaron los niveles de expresión de los genes detallados en la Tabla 4. Los oligonucleótidos específicos para estos genes previamente fueron diseñados utilizando la versión en línea del programa OligoAnalyzer v3.1 de Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/site>) y el programa Vector NTI 8. La especificidad fue comprobada mediante la versión en línea del programa Blastn del sitio NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La síntesis química de los oligonucleótidos fue contratada en la compañía Integrated DNA Technologies (EE.UU). Las muestras fueron analizadas por triplicado.

Tabla 3. Condiciones de RT-PCR cuantitativo

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de Ciclos
RT	50	30 minutos	1
Hot Start	95	10 minutos	1
Amplificación	90	15 segundos	45
Amplificación	60	15 segundos	45

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Secuencia de partidores para PCR cuantitativo.

Gen	Secuencia sentido 5'-3'	T _m °C	Secuencia antisentido 5'-3'	T _m °C
<i>OLR1</i>	AAACCCTTGCTCGGAAGCTGAA	63	TGCGGACAAGGAGCTGAACAAT	62
<i>CDH1</i>	CCTGGACTCCACCTACAGA	62	TGGATTCCAGAAACGGAGGC	62
<i>VIM</i>	CCGGGAGAAATTGCAGGAGGAG	62	AGGTCAAGACGTGCCAGAGAC	62
<i>ACTB</i>	TGTACCCTGGCATTGCCGACAG	62	ACGGAGTACTTGCCTCAGGAG	62

Fuente: Elaboración propia.

4.2.11 Zimografía.

Se prepararon geles al 8% de poliacrilamida copolimerizadas con 0,12 mg/mL de gelatina (Sigma). Se utilizaron como muestras el sobrenadante de cultivo procedente de las células estimuladas y sin estimular con LPS y LDL oxidada. La estimulación se realizó en medio con 2% de SBF. Las muestras fueron preparadas a una concentración final de 70-80 µg en buffer de carga 6X sin β-mercaptoetanol y separadas con tampón de corrida (16% Tris Base, 78% glicina y 5% SDS; pH 8.3) a 90 mV. Luego, los geles fueron lavados con una solución de tritón X-100 2,5% con el fin de quitar los residuos de SDS y se incubaron en

solución de incubación (50 mM Tris HCl; 0,15 M NaCl; 10 mM CaCl₂; 0,05% Azida de Sodio) por 72 horas a 37°C. Posteriormente, se realizó la tinción con azul de coomassie R-250 y se destiñó con solución de 10% de ácido acético. Se realizó densitometría y las bandas producto de la digestión de la gelatina se cuantificaron con el programa Image J 4.9 usando como control los sobrenadantes de células no tratadas.

4.2.12 Ensayo clonogénico.

Se sembraron 50 células/pocillo provenientes de las tres líneas de CCR y se trataron con LPS, LDL oxidada o la combinación en placas de 12 pocillos, y se incubaron por 12 días realizando cambios de medio cada tres días. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% y teñidas con cristal violeta al 0,1%. Las colonias fueron visualizadas con el programa ImageStudio usando el equipo Odyssey CLX.

4.2.13 Ensayo de migración e invasión por *Transwell*.

Para los ensayos de migración celular, se sembraron 50.000 células/pocillo (COLO320) y 100.000 células/pocillo (HCT116) previamente tratadas en medio sin suero sobre la cámara superior en el centro de un *transwell* (6,5 mm de diámetro y 8,5 µm de poro) correspondiente a placas de 24 pocillos. En la cámara inferior se añadió como quimioatrayente medio completo suplementado con SBF al 10%, asegurándose de que el medio estuviera en contacto con la membrana del *transwell*. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C en

atmósfera de CO₂. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo de ambas cámaras y las células de la cámara superior. Las células que migraron hacia la cámara inferior fueron fijadas con paraformaldehído (4%) durante 15 minutos. Los *transwell* se lavaron, se secaron y se realizó la tinción con violeta cristal al 0,5 % (p/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de colorante con agua corriente y se secaron los *transwells*. Finalmente, las membranas fueron cortadas y montadas en portaobjetos para su visualización en el microscopio. Las células en la parte inferior de la membrana representaron el número de células que migraron en presencia del quimioatrayente de acuerdo a los tratamientos. Para cada condición se realizaron 3 repeticiones.

Para los ensayos de invasión celular se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente, pero con ligeras diferencias. Antes de sembrar las células, la membrana del *transwell* se recubrió con una delgada capa de matrigel diluído 1/2 (aproximadamente 4 mg de proteínas de matriz extracelular/mL). Luego las células fueron sembradas y después de 48 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ se eliminó el medio de ambas cámaras y las células de la cámara superior. Las células que invadieron hacia la cámara inferior fueron fijadas con paraformaldehído (4%) y posteriormente teñidas con cristal violeta al 0,5 % (p/v). Se eliminó el exceso de colorante y las membranas fueron cortadas y montadas en portaobjetos para su visualización en el microscopio. Las células en la parte inferior de la membrana representaron el número de células que

invadieron en presencia del quimioatrayente de acuerdo a los tratamientos. Para cada condición se realizaron 3 repeticiones.

4.2.14 Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos fueron graficados en *Graphpad prism 6.0* y los datos procesados y presentados según media \pm desviación estándar. La significancia estadística se evaluó mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Tukey. Las diferencias significativas entre los grupos se calcularon con un P valor $\leq 0,05$.



5 RESULTADOS

5.1 Efecto de LPS y LDLox sobre la viabilidad de líneas celulares de CCR humano.

Para evaluar el efecto de LPS y LDLox sobre la viabilidad de las tres líneas celulares de CCR humano en estudio, se empleó el ensayo de reducción de sales de Tetrazolio (MTT). Se utilizó un rango de concentraciones crecientes de LPS (0-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de LDLox (0-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en un tiempo de incubación de 24 y 48 horas, respectivamente. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad (%) con respecto al control sin tratamiento (Figura 2).

Los resultados obtenidos mostraron diferencias en la sensibilidad a LDLox en las tres líneas celulares de CCR. La línea celular COLO320 resultó ser más sensible al tratamiento con LDLox, disminuyendo en un 40% su viabilidad celular a concentraciones por sobre los 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox (concentración citotóxica). La línea celular HCT116 resultó ser más resistente a todas las concentraciones de LDLox ensayadas, seguida de la línea SW620 que solo fue susceptible a los 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox (disminución de la proliferación celular en un ~50%(concentración citotóxica)) (Figura 2A). Por otro lado, al tratar las líneas celulares con LDLn (fracción LDL nativa) no se observó un efecto estadísticamente significativo sobre la proliferación de las líneas

celulares COLO320, SW620 y HCT116 (Figura 2B). Por otro lado, no se observó un efecto sobre la viabilidad celular en ninguna de las líneas celulares en estudio a las concentraciones de LPS estudiadas (Figura 2C).

Además, se observó que los tratamientos combinados con LPS y LDLox a las concentraciones escogidas, no generaron cambios significativos en la viabilidad celular (Figura 2D).



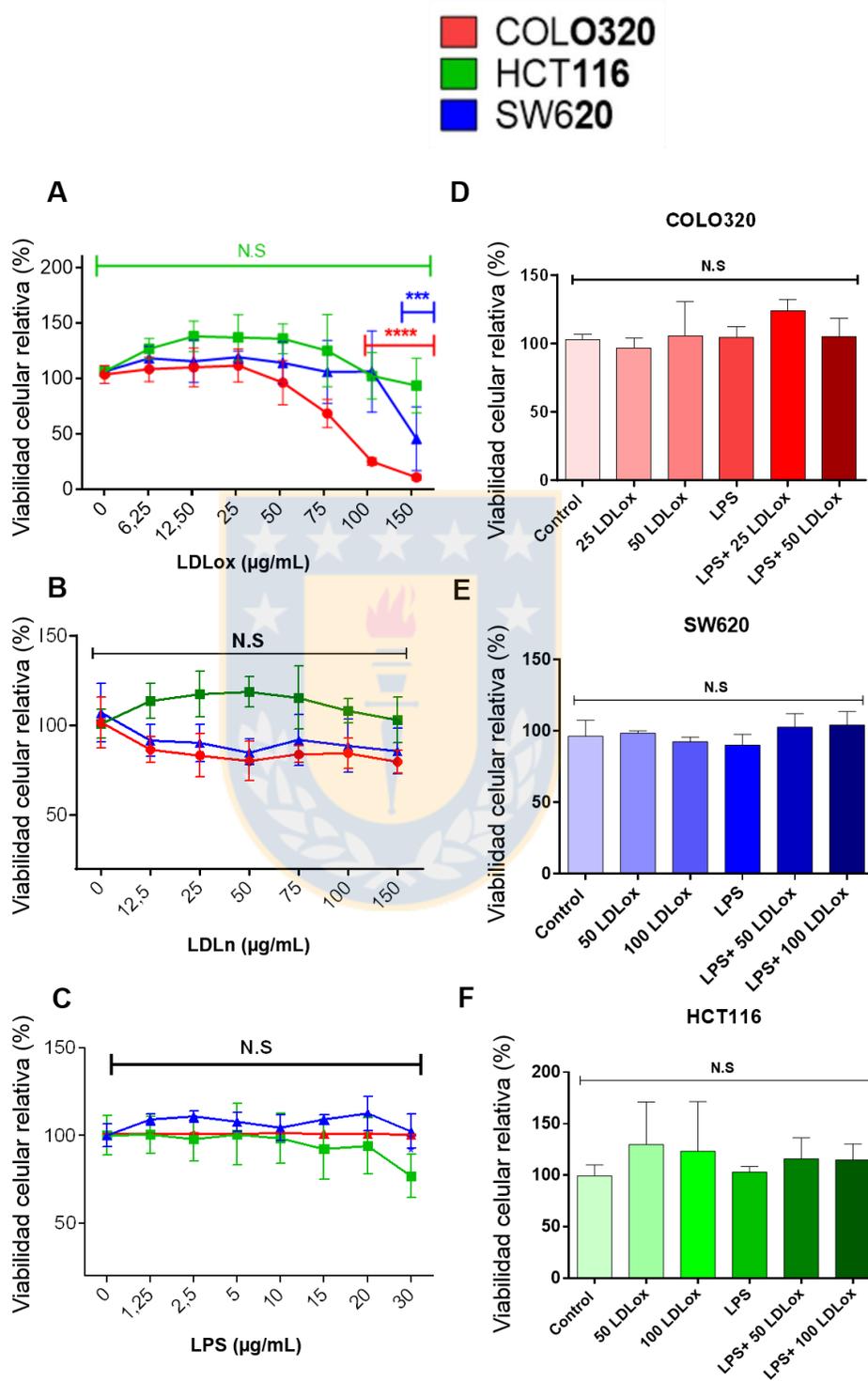


Figura 2. Efecto individual de (A) LDLox, (B) LDLn, (C) LPS y combinado (D), (E) y (F) sobre la viabilidad de tres líneas celulares de CCR humano. La viabilidad celular de tres líneas celulares de CCR (COLO320, HTC116 y SW620) fue evaluada por ensayos de MTT a las (A) y (B) 48, (C) 24 horas de tratamiento y (D), (E) y (F) 72 horas. (B) Tratamiento con LDLn como control. Para el análisis de tratamientos combinados, se utilizaron dos concentraciones de LDLox (COLO320, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$; SW620 y HCT116, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$). Los puntos (A, B y C) y barras (D, E y F) representan promedio \pm desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n = 5$. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (Fuente: Elaboración propia).

5.2 Expresión basal de LOX-1 en células de cáncer de colon.

La expresión basal de LOX-1 en las tres líneas celulares de cáncer colorrectal (COLO320, HCT116 y SW620) se analizó mediante ensayos de inmunodetección (Western Blot e Inmunofluorescencia). Como control positivo de expresión de LOX-1 se utilizó la línea celular HEK-LOX1 que sobreexpresa este receptor y como control negativo la línea celular CHO (Figura 3A). Los resultados obtenidos muestran que en las tres líneas celulares de cáncer colorrectal se detectó la expresión del receptor LOX-1 (Figura 3A y 3B).

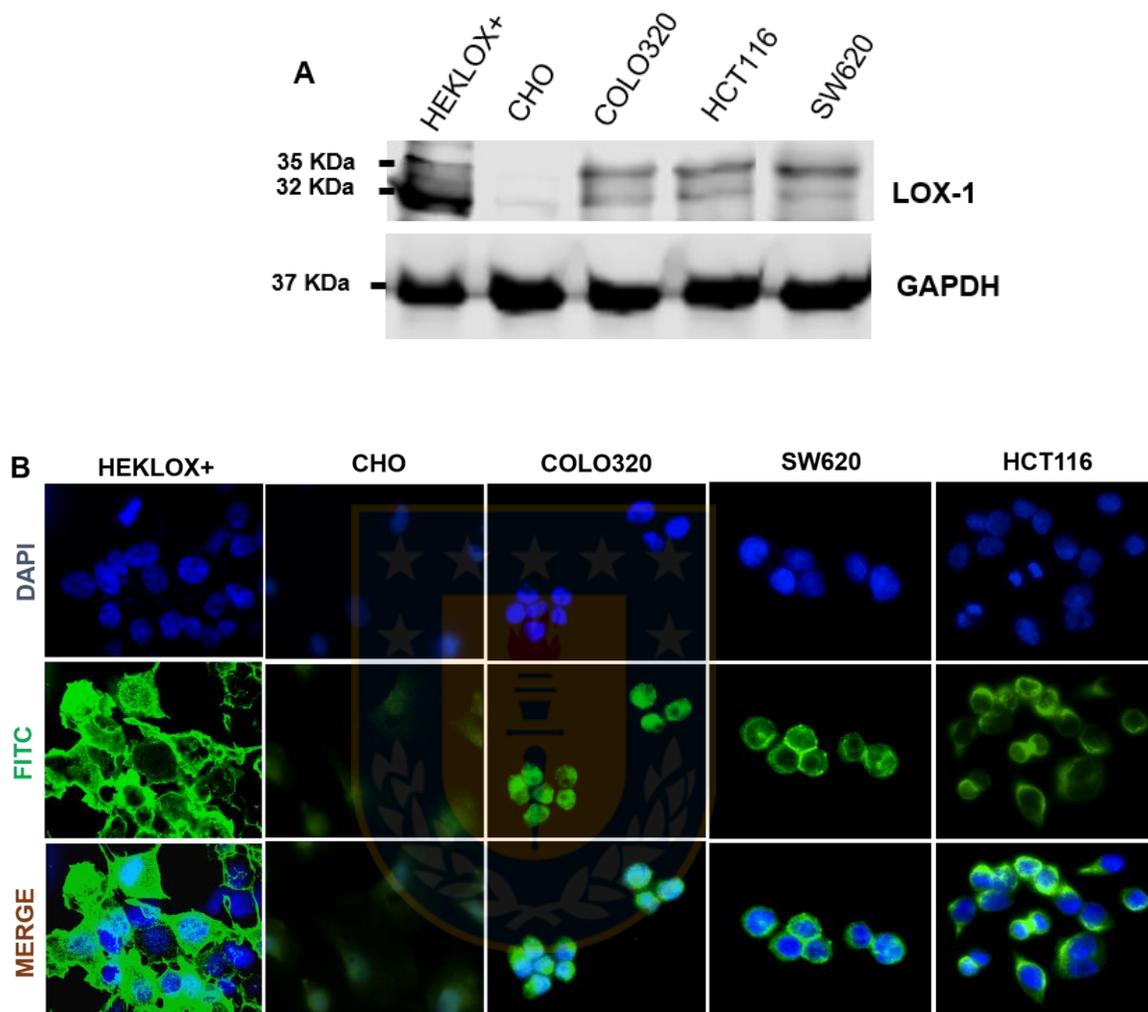


Figura 3. Expresión basal del receptor LOX-1 en las líneas celulares de cáncer colorrectal humano COLO320, SW620 y HCT116. La expresión basal del receptor LOX-1 se evaluó mediante ensayos de inmunodetección; (A) western blot e (B) inmunofluorescencia en las tres líneas celulares de CCR humano. A: Western Blot. Análisis de la expresión del receptor a partir de 40 ug de extractos de proteínas de células totales. B: Inmunofluorescencia. En ambos ensayos se utilizó un anticuerpo policlonal específico para LOX-1. Microscopio Olympus IX81/DSU. Objetivo 40X. (Fuente: Elaboración propia).

5.3 Efecto individual y combinado de LPS y LDLox sobre la expresión de LOX-1 y TLR-4.

El efecto de distintas concentraciones de LPS y LDLox en los niveles de expresión relativa del receptor LOX-1 y del receptor TLR4 se analizaron en las tres líneas celulares de CCR humano (COLO320, HCT116 y SW620) mediante inmunodetección por Western Blot. Para el tratamiento con LPS se ensayaron las concentraciones de 0; 1,25; 2,5; 5; 10 $\mu\text{g/mL}$ y para LDLox las concentraciones de 0; 12,5; 25; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$. Además, los niveles de expresión del receptor LOX-1 se determinaron en las condiciones combinadas de LPS y LDLox mediante ensayos de Western Blot y RT-PCR cuantitativo.

Se observó que el tratamiento con LPS indujo un aumento significativo en los niveles de expresión proteica de LOX-1 en las líneas celulares COLO320 y SW620. En las células COLO320, el aumento de la expresión relativa de LOX-1 fue de 1,7 veces a la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. En las células SW620 se detectó un aumento significativo en los niveles de expresión de LOX-1 al ser estimuladas con 1,25; 2,5 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, alcanzando su mayor nivel de expresión a los 5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (aumento relativo de 2 veces). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de LOX-1 en la línea celular HCT116 cuando fueron estimuladas con las concentraciones de LPS empleadas.

Por otra parte, se detectó un aumento significativo en los niveles de expresión del receptor TLR-4 en las células COLO320 estimuladas con 2,5; 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. En las células SW620, se detectó un aumento significativo en los niveles de expresión del receptor TLR-4 al ser estimuladas con 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. Finalmente, para las células HCT116, los niveles de expresión de TLR-4 aumentaron significativamente cuando las mismas fueron estimuladas con 1,25; 2,5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (Figura 4).

En la línea celular COLO320 la LDLox indujo un aumento significativo de la expresión de LOX-1 de 2 y 2,3 veces a concentraciones de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox, respectivamente (Figura 5). En la línea celular SW620 la expresión de LOX-1 aumentó significativamente a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox proporcionando un aumento superior de 2,6 veces la expresión del receptor. En la línea celular HCT116, se detectó un aumento significativo de los niveles de expresión de LOX-1 de 2,4 y 2,5 veces a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox, respectivamente (Figura 5). Con estos resultados, se seleccionaron las concentraciones utilizadas en los tratamientos combinados de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y LDLox (25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las células COLO320; 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las células SW620 y HCT116).

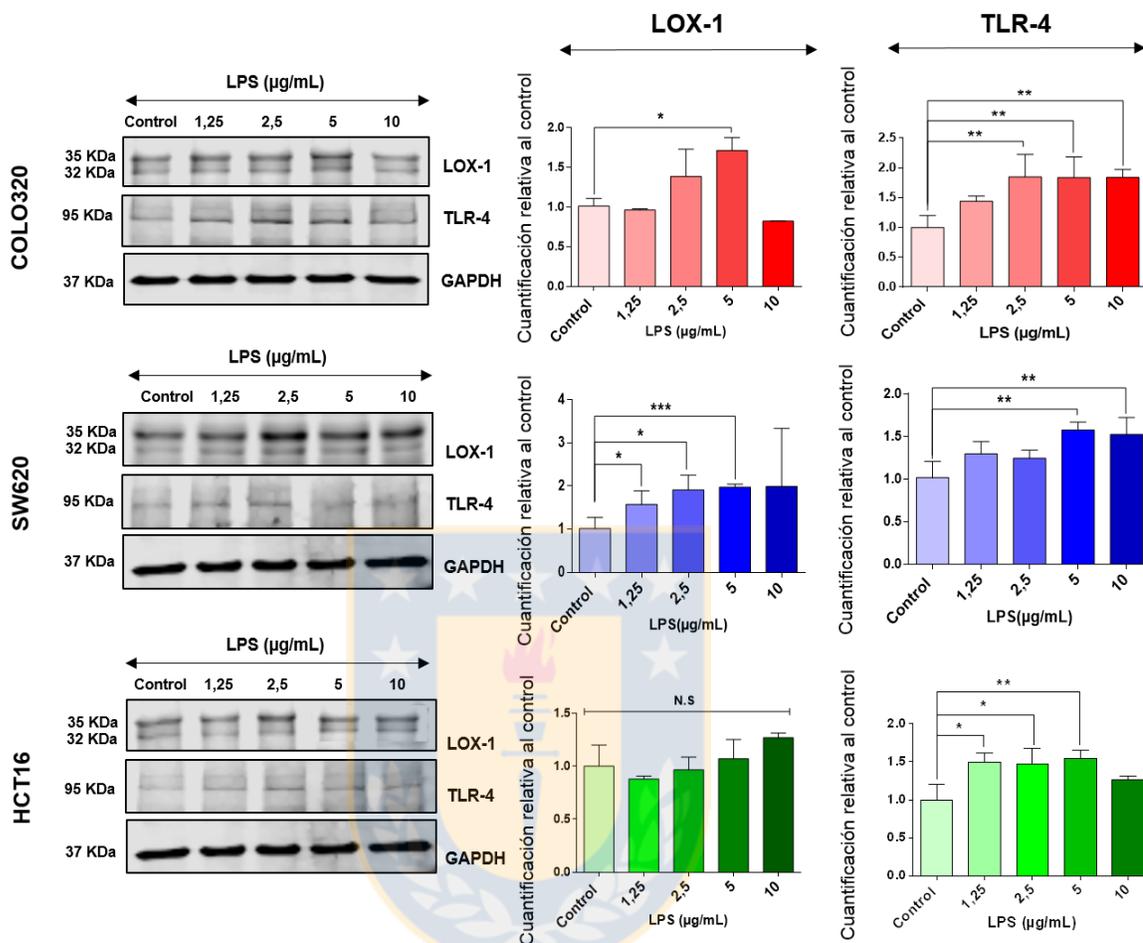


Figura 4. Efecto de LPS sobre la expresión de LOX-1 y TLR-4 en células COLO320, SW620 y HCT116 de cáncer colorrectal. Los niveles de expresión de los receptores LOX-1 y TLR-4 se evaluaron por Western Blot. Las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de LPS (0; 1,25; 2,5; 5 y 10 µg/mL) por 24 horas. Las barras representan promedio \pm desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n = 4$. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (Fuente: Elaboración propia).

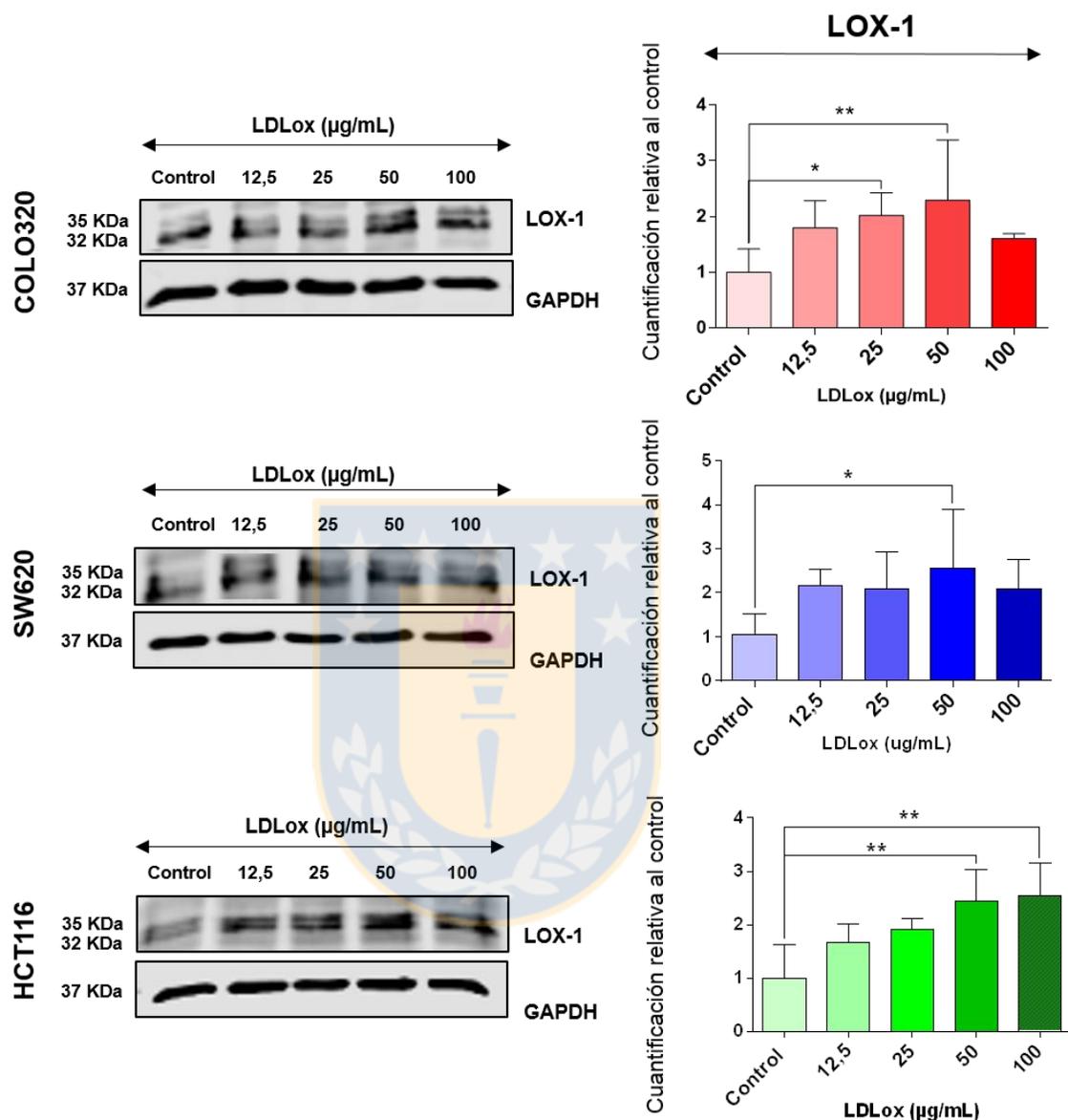


Figura 5. Efecto de LDLox sobre la expresión de LOX-1 en células COLO320, SW620 y HCT116 de cáncer colorrectal. Los niveles de expresión del receptor LOX-1 se evaluó por Western Blot. Las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de LDLox (0; 12,5; 25; 50 y 100 µg/mL) por 48 horas. Las barras representan promedio \pm desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n = 4$. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (Fuente: Elaboración propia).

El efecto combinado de LPS y de LDLox sobre los niveles de expresión del receptor LOX-1 se evaluó mediante Western Blot y RT-PCR cuantitativo. En la línea celular COLO320 los niveles de expresión proteica de LOX-1 aumentaron 1.8 y 1.6 veces al estimular las células con LPS y LDLox a 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. En la línea SW620 los niveles de expresión de LOX-1 aumentaron 3 y 4 veces en los tratamientos con LPS y LDLox a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. En la línea HCT116 el tratamiento con LPS y LDLox a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la expresión de LOX-1 aumentó 1.70 y 1.76 veces. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con LDLox solos y combinados con LPS en las líneas celulares COLO320 y HCT116. En la línea celular SW620 sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la combinación de ambos estímulos. Esto sugiere que solo en las células SW620 existe un efecto sinérgico de ambos estímulos sobre la expresión del receptor de la combinación LPS/LDLox comparado con los tratamientos individuales. (Figura 6).

Los resultados obtenidos a partir de la expresión de RNA mensajero (*OLR-1*) mediante RT-PCR cuantitativo, mostraron la misma tendencia obtenida en los ensayos de inmunodetección. En los ensayos de RT-PCR se utilizó una sola concentración de LDLox (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ /COLO320 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ /HCT116 y SW620). Sin embargo, solo en la línea COLO320 se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos individuales y combinados con respecto al control (50 LDLox=3.4; LPS=3.5 y LPS/LDLox=3.7 veces), sin diferencias entre ellos. Por otro lado, en las líneas SW620 y HCT116, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos, a pesar que en la línea HCT116 si existe la tendencia al aumento en la expresión del receptor bajo los tratamientos con LDLox, LPS y la combinación (Figura 7).

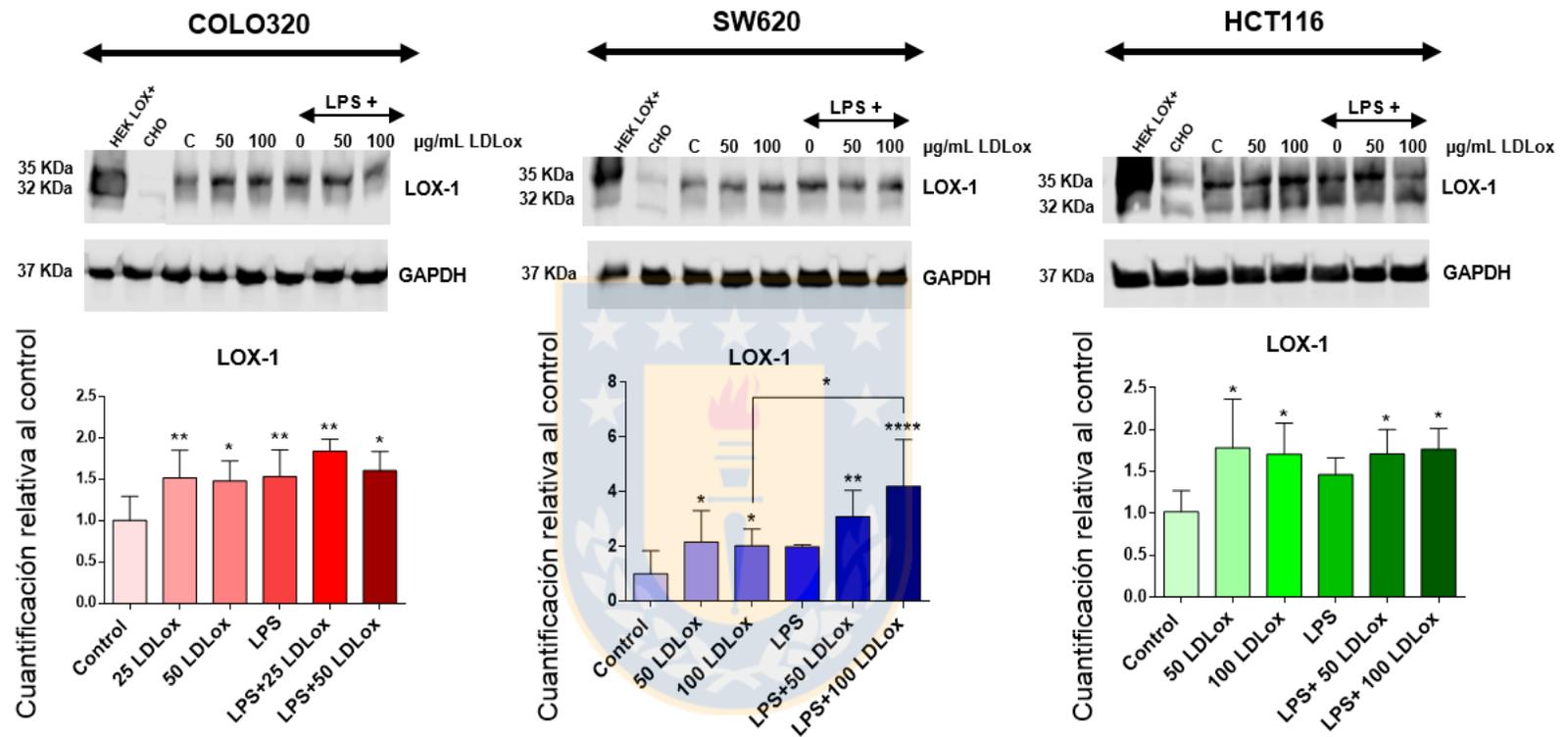


Figura 6. Efecto del co-tratamiento LPS/LDLox sobre la expresión de LOX-1 en células COLO320, SW620 y HCT116 de cáncer colorrectal humano. Los niveles de expresión del receptor LOX-1 se evaluaron por Western Blot. Las células fueron previamente estimuladas con LPS (5 µg/mL) por 24 horas, posteriormente las líneas celulares se trataron con LDLox (25 y 50 µg/mL para COLO320; 50 y 100 µg/mL para SW620 y HCT116) por otras 48 horas. Las barras representan promedio ± desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n = 7$. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (Fuente: Elaboración propia).

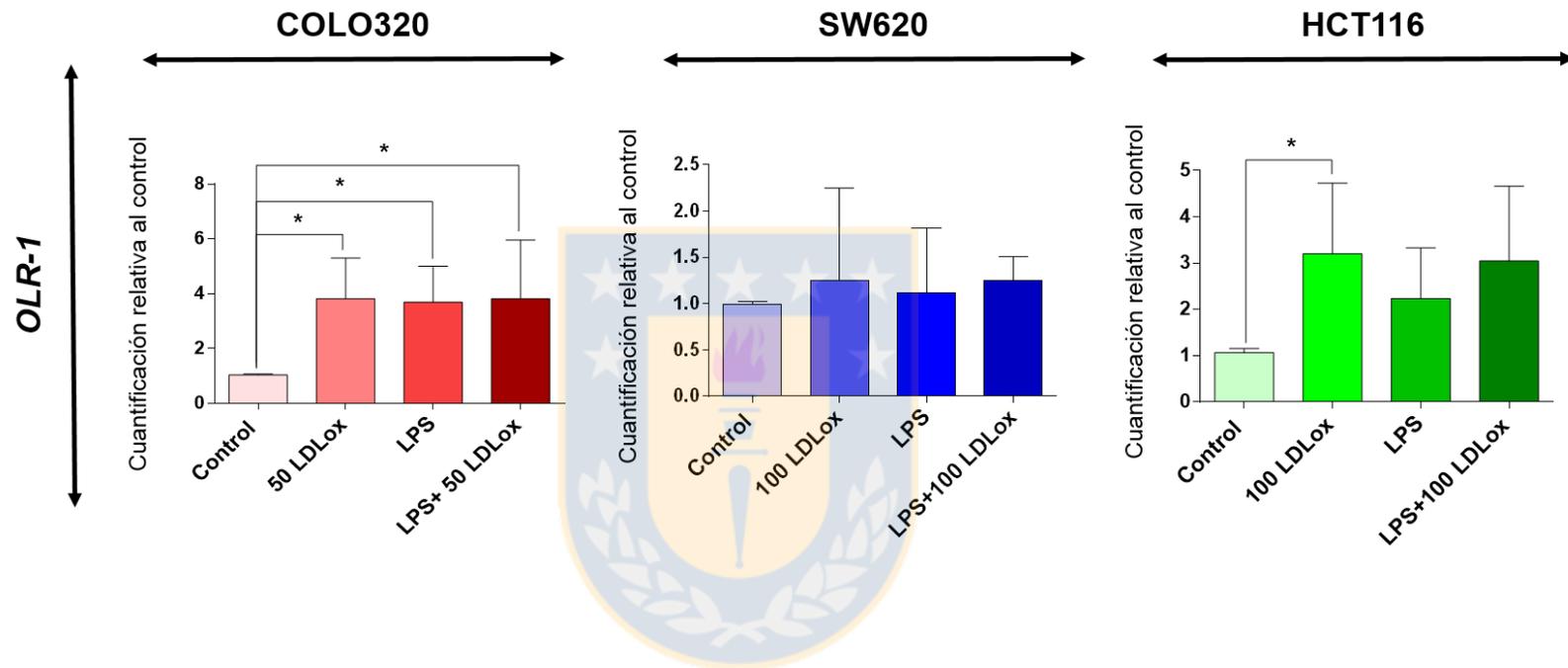


Figura 7. Efecto del co-tratamiento LPS/LDLox sobre la expresión de ARN mensajero de LOX-1 en células COLO320, HCT116 y SW620 de cáncer colorrectal. Los niveles de expresión del receptor LOX-1 se evaluaron por RT-PCR cuantitativo. Las células fueron previamente estimuladas con LPS (5 µg/mL) por 24 horas. Luego, todas las líneas celulares se trataron con LDLox (50 µg/mL para COLO320 y 100 µg/mL para SW620 y HCT116) por 24 horas. Las barras representan promedio \pm desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n = 4$. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (Fuente: Elaboración propia).

5.4 Efecto de LPS y LDLox sobre la expresión de marcadores de transición epitelio-mesenquimal.

Para determinar el efecto de LPS y LDLox en el proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM), se analizó su efecto sobre la expresión de tres marcadores en todas las líneas celulares de cáncer colorrectal (COLO320, HCT116 y SW620) en estudio. Se midió la expresión de dos marcadores de origen epitelial (Placoglobina y E-cadherina) y de un marcador de origen mesenquimal (Vimentina), mediante western blot y RT-PCR cuantitativo. Se observó que el tratamiento co-tratamiento LPS/LDLox produjo un aumento significativo en la expresión de vimentina en las tres líneas celulares de CCR ensayada (1.6, 5.0 y 5.9 veces, respectivamente). A su vez, la expresión de E-cadherina se afectó negativamente en las líneas celulares COLO320 (0,49 veces) y SW620 (0,54 veces) al comparar su expresión en las células no tratadas, no así, en la línea celular HCT116 donde a pesar de que se observó una tendencia a la disminución del marcador, no se evidenciaron cambios estadísticamente significativos con los estímulos. Con respecto a la expresión de placoglobina, el tratamiento de las líneas celulares con LPS/LDLox disminuyó la expresión de este marcador en las líneas COLO320 (0,54 veces) y HCT116 (0,64 veces), mientras que la expresión de este mismo marcador en la línea celular SW620 no generó cambios significativos (Figura 8).

Al analizar la expresión de estos mismos marcadores con los tratamientos individuales, no se observó significancia estadística en la expresión de vimentina, placoglobina y e-cadherina en la línea celular COLO320. Por otro lado, en la línea celular SW620 todos los tratamientos produjeron un efecto sobre la expresión de E-caherina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDLox= 0,72 veces; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDLox= 0,66 veces; LPS= 0,49 veces). Sin embargo, los datos obtenidos para la expresión de placoglobina no fueron concluyentes.

En la línea celular HCT116, la expresión de vimentina se vió afectada de la misma forma con los tratamientos con LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (4,6 veces) el co-tratamiento LPS/ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDLox (4,4 veces), pero no con LPS. La máxima expresión se obtuvo con la combinación LPS/ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDLox (5,9 veces). Esta misma tendencia se observó al medir la expresión de placoglobina, donde se observó que los tratamientos con LDLox (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) afecta negativamente su expresión, al igual que el tratamiento combinado, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Con respecto a la expresión de e-cadherina, a pesar de observarse una disminución de la expresión con los tratamientos, éstos no fueron significativos (Figura 8).

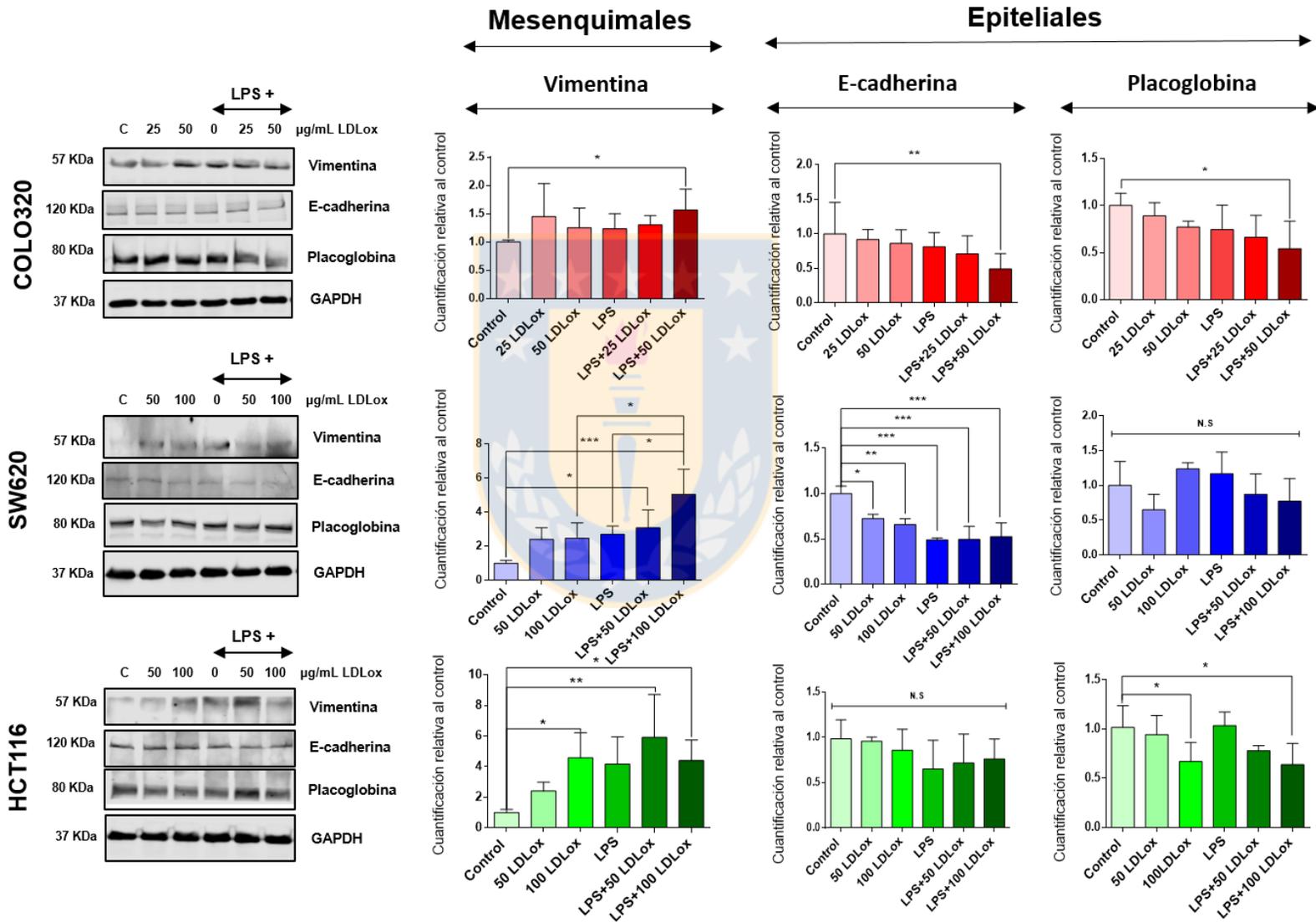


Figura 8. Efecto individual y combinado de LPS y LDLox sobre la expresión de marcadores de TEM en células COLO320, HCT116 y SW620 de cáncer colorrectal. Las células fueron previamente estimuladas con LPS (5 µg/mL) por 24 horas. Posteriormente, las líneas celulares se trataron con LDLox (25 y 50 µg/mL para COLO320; 50 y 100 µg/mL para SW620 y HCT116) por 48 horas para la medición de la expresión de tres marcadores de TEM (placoglobina, E-caherina y vimentina) que fue evaluada por western blot. Las barras representan promedio ± desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, n = 8. * P≤ 0,05; ** P≤0,01; *** P≤0,001. (Fuente: Elaboración propia).

Los resultados obtenidos respecto a la expresión del RNA mensajero mediante RT-PCR cuantitativo, muestran una tendencia similar a la obtenida en los ensayos de inmunodetección (Figura 8). Respecto a la expresión de *VIM* (gen de la vimentina), en las líneas celulares COLO320 y SW620, no se observó diferencias significativas con ninguno de los tratamientos. Mientras que en la línea celular HCT116 se observó un aumento significativo de 1.8 veces con el tratamiento combinado (LPS/ 100 µg/mL LDLox) (Figura 9).

La expresión de *CDH-1* (gen de la E-cadherina), se vió afectada negativamente en las tres líneas de CCR ensayadas. Tanto los tratamientos individuales como la combinación afectaron negativamente la expresión de *CDH-1*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos individuales con respecto a la combinación LPS/LDLox en ninguna de las líneas celulares (Figura 9).

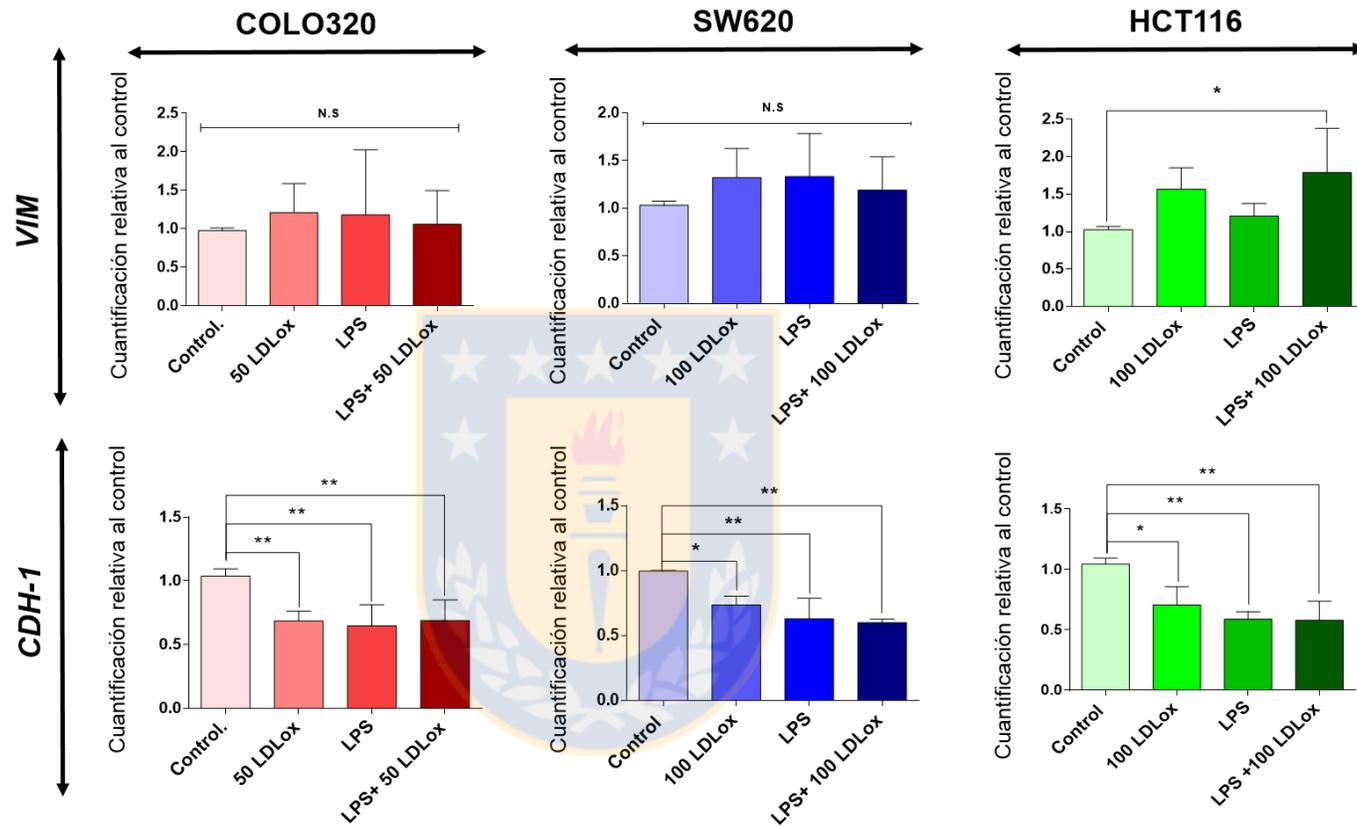


Figura 9. Efecto individual y combinado de LPS y LDLox sobre la expresión de ARN mensajero de marcadores de TEM en células COLO320, HCT116 y SW620 de cáncer colorrectal. Las células fueron previamente estimuladas con LPS (5 µg/mL) por 24 horas. Luego, todas las líneas celulares se trataron con LDLox (50 µg/mL para COLO320 y 100 µg/mL para SW620 y HCT116) por 24 horas para la medición de la expresión de dos marcadores de TEM (*VIM* y *CDH-1*) que fue evaluada por RT-PCR cuantitativo. Las barras representan promedio ± desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, n = 4. * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001. (Fuente: Elaboración propia).

5.5 Efecto de LPS y LDLox sobre la actividad de metaloproteinasas de matriz.

Para determinar si LPS y LDLox afecta la actividad gelatinasa de MMP-9 y MMP-2, las tres líneas celulares de CCR humano (COLO320, SW620 y HCT116) fueron estimuladas con los tratamientos individuales y combinados por 72 horas. Los medios de cultivo fueron colectados y concentrados para medir la actividad de MMP-9 y MMP-2 por zimografía. Además, se utilizó como control de las carga proteínas totales de los medios de cultivos. Se observó que los tratamientos combinados en las líneas celulares COLO320 y SW620 aumentaron significativamente la actividad gelatinasa de ambas metaloproteinasas de matriz (2,22 veces para MMP-9 y 2 veces para MMP-2) y SW620 (2,23 veces para MMP-9 y 2,8 veces). A excepción de la línea celular HCT116 donde no se observó un aumento en la actividad de MMP-9 ni de MMP-2. No se observaron efectos sobre la actividad de MMP-9 y MMP-2 con los tratamientos individuales (Figura 10).

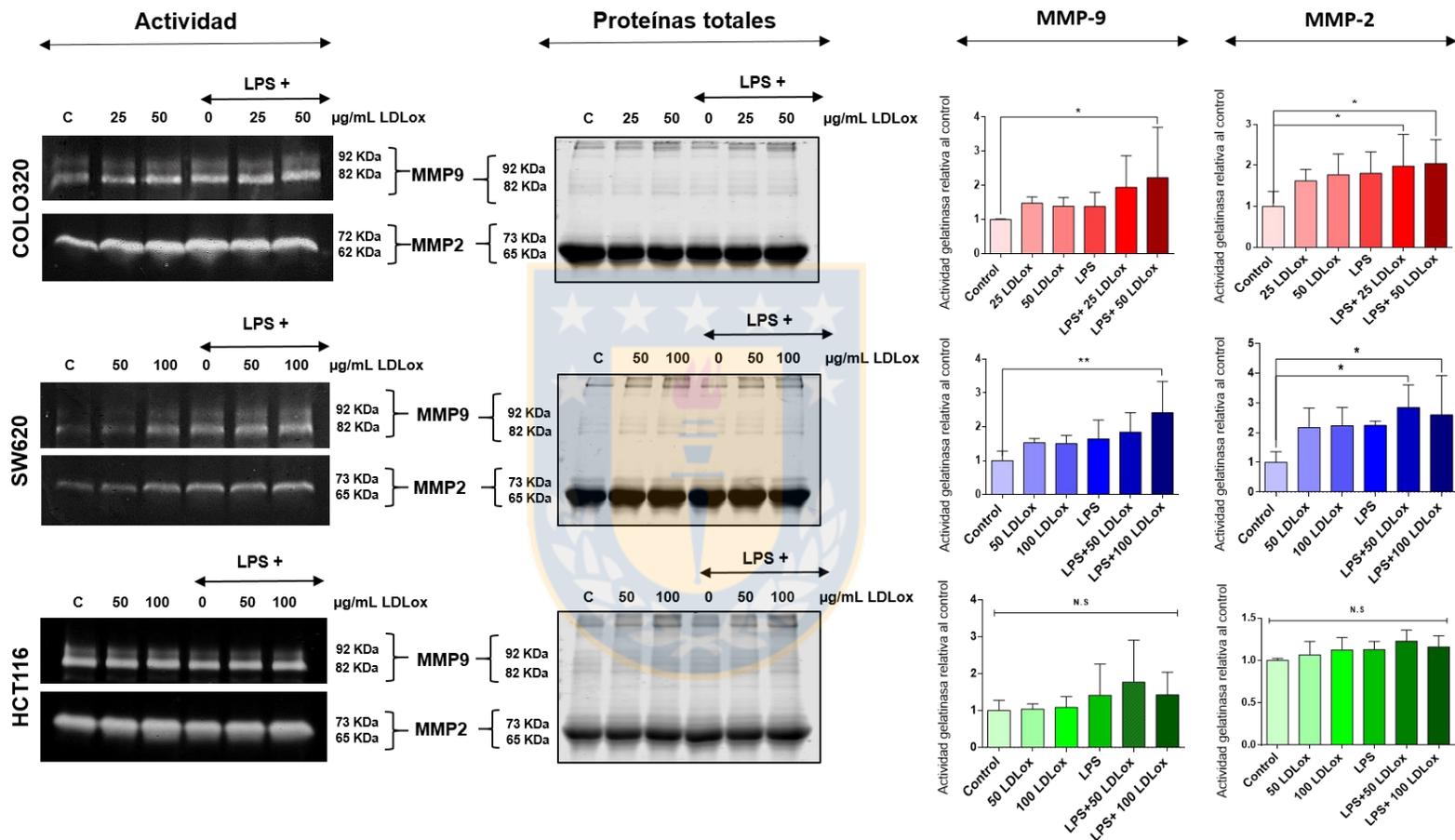


Figura 10. Efecto de LPS y LDLox sobre la actividad de MMP-9 y MMP-2 sobre células COLO320, HCT116 y SW620 de CCR. Las células fueron tratadas con LPS, LDLox y la combinación por 72 horas. La actividad gelatinasa de MMP-9 y MMP-2 fue evaluada por zimografía a las 72 horas. Las barras representan promedio ± desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, n = 8. * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001. (Fuente: Elaboración propia).

5.6 Efecto de LPS y LDLox sobre la formación de colonias de las líneas celulares de CCR humano.

Se realizó un estudio de crecimiento celular incubando las líneas celulares de cáncer colorrectal humano (COLO320, SW620 y HCT116) con concentraciones crecientes de LDLox (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los tratamientos fueron realizados con medio RPMI o DMEM suplementado al 5% de SBF, en períodos de tiempo de 72 horas en un tiempo total de tratamiento de 12 días (tratamiento cada tres días). Se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia emitida por las colonias formadas en la línea celular COLO320 (1,3 veces) a concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox. Las células HCT116 respondieron a todas las concentraciones de LDLox utilizadas (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un máximo en la intensidad de fluorescencia de 1,45 veces a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox respecto al control. Sin embargo, no se observó un aumento en la fluorescencia emitida por las colonias en la línea celular SW620 a ninguna de las concentraciones de LDLox utilizadas (Figura 11A).

Para estudiar el efecto de LPS y la combinación con LDLox sobre el crecimiento celular, se realizó el mismo ensayo con las condiciones descritas anteriormente. En la línea celular COLO320, al igual que en los resultados anteriores, LDLox por sí sola si genera un efecto positivo en la formación de las colonias, no obstante, el tratamiento con LPS no generó efecto alguno sobre el estas, mientras que el co-tratamiento, generó el efecto opuesto al de la LDLox

(disminución a 0,6 veces). En la línea celular SW620 al igual que los ensayos con LDLox, ninguno de los tratamientos generó un efecto sobre el crecimiento de las colonias. A diferencia de las anteriores, la línea celular HCT116 si respondió positivamente a los tratamientos con LPS y la combinación con LDLox, donde se observó un aumento en el crecimiento celular (LPS, aumento de 1,2 veces; LDLox aumento de 1,3 veces y LPS/LDLox aumento de 1,6 veces) (Figura11B).



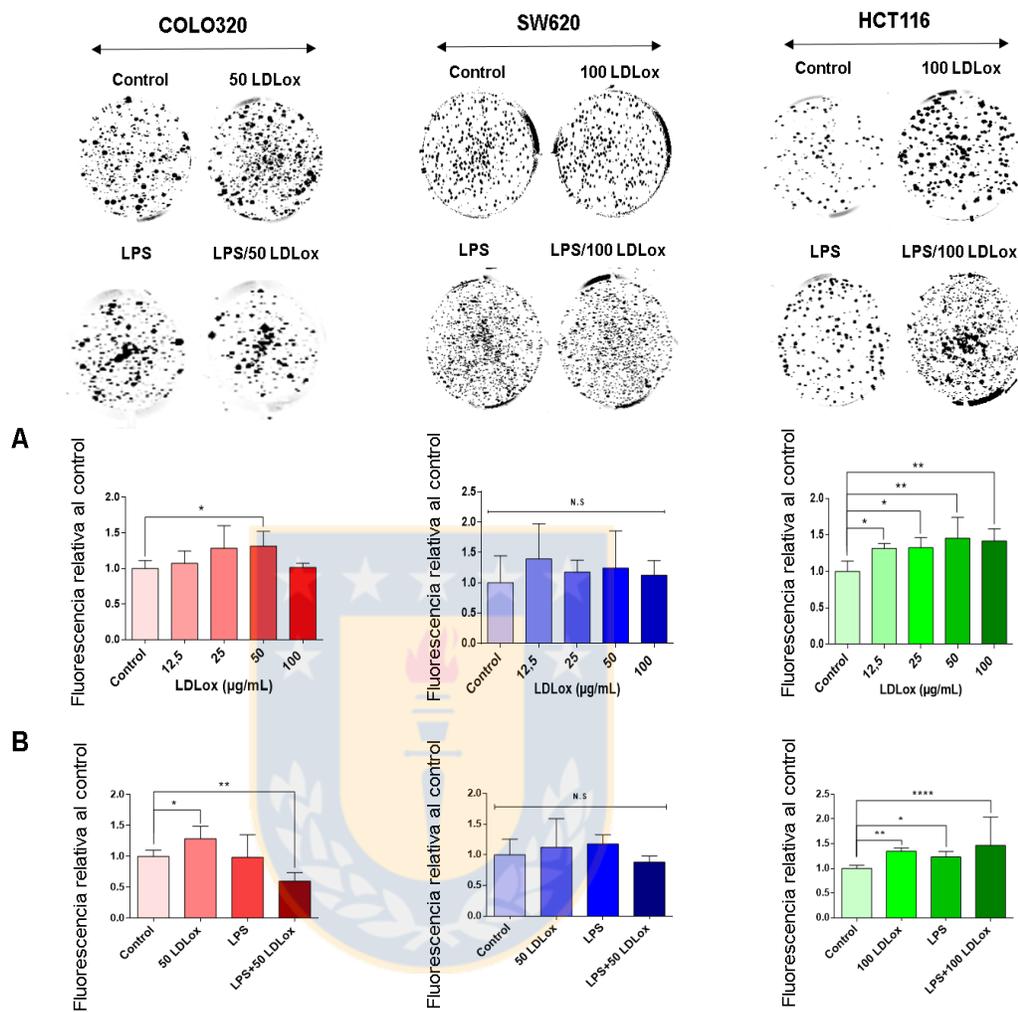


Figura 11. Efecto de LDLox y el co-tratamiento LPS/LDLox sobre la formación de colonias de tres líneas celulares de cáncer colorrectal. Ensayos clonogénicos en células COLO320, SW620 y HCT116 de cáncer de colorrectal humano tratadas con (A) distintas concentraciones de LDLox (0-100 µg/mL) por 48 horas y con las (B) combinaciones LPS y LDLox. Las colonias fueron teñidas con cristal violeta 0,1% a los 10 días de cultivo y visualizadas con el programa ImageStudio usando el equipo Odyssey CLX. Las barras representan promedio \pm desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n = 8$. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (Fuente: Elaboración propia).

5.7 Efecto del co-tratamiento LPS y LDLox sobre la migración de las células de CCR humano.

Se analizó el efecto de LPS y LDLox sobre la migración de las líneas celulares COLO320 y HCT116 de CCR mediante un ensayo de migración por transwell. Las células fueron tratadas con LPS (5µg/mL), LDLox (COLO320 50 µg/mL; HCT116 100 µg/mL) y la combinación durante 72 horas. Después de los tratamientos las células fueron sembradas en *transwells* y teñidas a las 24 horas. Se observó que el tratamiento combinado indujo un aumento significativo (aumento relativo de 4,4 veces) en la migración de las células con respecto al control sin tratamiento. Además, se observaron diferencias en la migración celular a partir de los tratamientos individuales con LPS y LDLox, sin embargo, no fue estadísticamente significativo.

Se observó en la línea celular HCT116 un aumento en la migración celular solo con los tratamientos combinados (aumento relativo de 2,5 veces) (Figura 12).

5.8 Efecto del co-tratamiento de LPS y LDLox sobre la invasión de las células de CCR humano.

Se analizó el efecto de LPS y LDLox sobre la invasión de las líneas celulares COLO320 y HCT116 de CCR mediante un ensayo de invasión por transwell. Las células fueron tratadas con LPS (5 µg/mL), LDLox (COLO320 50 µg/mL; HCT116 100 µg/mL) y el co-tratamiento durante 72 horas. Después de los tratamientos las células fueron sembradas en *transwells* previamente recubiertos con matrigel y teñidas a las 48 horas. En la línea celular COLO320 se observó que el tratamiento con LDLox y su combinación con LPS indujo un aumento significativo (aumento relativo de 2,8 y 2,6 veces, respectivamente) en la invasión de estas células con respecto al control sin tratamiento. Se observó un aumento en la invasión celular con LPS, sin embargo, no fue estadísticamente significativo. En la línea celular HCT116 en cambio, no se observaron cambios estadísticamente significativos con ninguno de los tratamientos en la invasión de estas células (Figura 13).

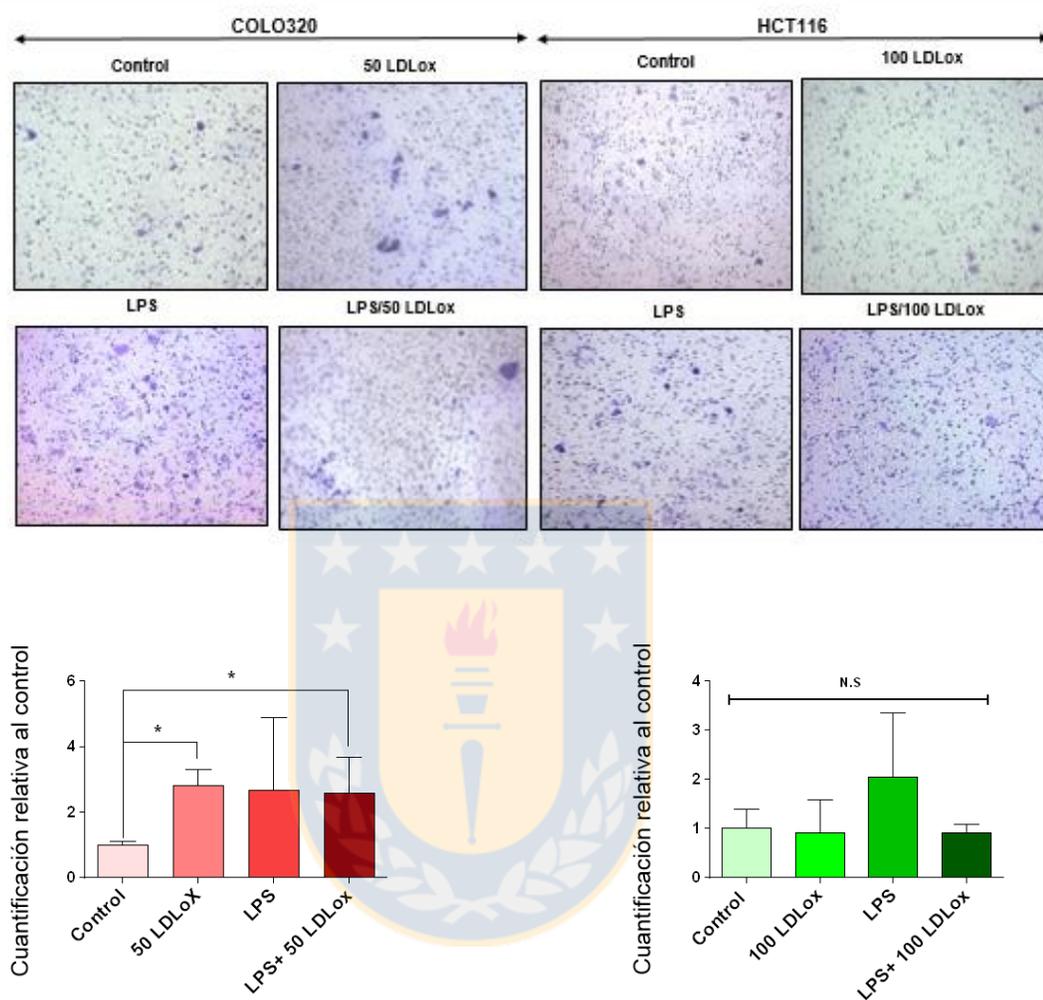


Figura 13. Efecto del co-tratamiento LPS/LDLox sobre la invasión de las líneas COLO320 y HCT116 de cáncer colorrectal humano. Ensayo de invasión por *transwell* en células COLO320 y HCT116 de cáncer de colon tratadas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox (COLO320), con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox (HCT116), LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el co-tratamiento LPS/LDLox por 72 horas. Las células que invadieron fueron teñidas con violeta cristal 0,2% y contadas en el programa ImageJ 4.9. La cantidad de células que invadieron fue comparada y normalizada contra el control sin tratamiento. Las fotos fueron tomadas por microscopía óptica. Microscopio Olympus IX81/DSU. Objetivo 10X. Las barras representan promedio \pm desviación estándar. ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n = 4$. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. (Fuente: Elaboración propia)

6 DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias más comunes y agresivas a nivel mundial, posicionándose en el tercer lugar a nivel mundial. Un 8,6% del total de las muertes por cáncer en Chile en el año 2012 se debieron al CCR, considerándose la segunda causa de mortalidad por cáncer después del cáncer gástrico (International Agency for Research on Cancer; Kuipers et al., 2015).

Algunos factores como la obesidad, dislipidemias y enfermedades inflamatorias intestinales se han relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (Moghaddam, Woodward, y Huxley, 2007; Terzić et al., 2010). Sin embargo, los mecanismos que relacionan a estos factores con este tipo de neoplasia en particular no se han dilucidado por completo, por lo que resulta relevante continuar investigando en este tema en particular.

Durante el estudio de los mecanismos implicados en la progresión tumoral, se ha relacionado a la LDLox con un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer, incluyendo CCR (Suzuki et al., 2004). Estudios clínicos previos sugieren una asociación entre las concentraciones elevadas de LDLox en suero y un mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (Suzuki et al., 2004; Diakowska et al., 2015). Además, se ha descrito que los tumores colorrectales producen y acumulan LDLox, lo que sugiere una estrecha correlación entre la disfunción de los lípidos y la transformación maligna en el tracto intestinal (Keshavarzian et al., 1992; Murdocca et al., 2016).

El receptor LOX-1 presente en la membrana plasmática reconoce e internaliza la LDLox, por lo que ha sido ampliamente estudiado en enfermedades como la disfunción endotelial, aterosclerosis, infarto agudo al miocardio, accidente cerebrovascular, diabetes, hipertensión, síndrome metabólico, obesidad y cáncer (Hirsch et al., 2010; Yoshimoto et al., 2011). Particularmente, en cáncer colorrectal, se ha visto que LOX-1 se encuentra sobreexpresado en tumores de bajo y alto grado de malignidad (Murdocca et al., 2016). Estas observaciones obtenidas mediante inmunohistoquímica en tejidos humanos demuestran que la expresión de la proteína LOX-1 está modulada en la tumorigénesis del colon (Murdocca et al., 2016). Además, un metanálisis sobre los perfiles de expresión de LOX-1 a nivel de ARN mensajero, mostró un aumento de un 20% en su expresión en líneas celulares de CCR, lo que sugiere su posible participación en la tumorigénesis (Hirsch et al., 2010). Curiosamente, los sujetos obesos no solo tienen un aumento en los niveles séricos de colesterol LDL y triglicéridos, sino también un mayor estado de estrés oxidativo llevando a la conversión de LDL en LDLox (Lu et al., 2011). En pacientes con cáncer el microambiente tumoral oxidativo y proinflamatorio, rico en especies reactivas del oxígeno, podría estar promoviendo la modificación de LDL por lipoperoxidación, evitando el reconocimiento de LDL por su receptor y favoreciendo su captación por receptores scavenger de LDLox (Fiaschi y Chiarugi, 2012; González-Chavarría et al., 2014).

Se ha descrito en estudios *in vivo* que los LPS aumentan la tumorigénesis y la cantidad de lesiones metastásicas en hígado de ratones inmunosuprimidos, lo que indica que también tendrían una función en la progresión y metástasis del cáncer de mama humano (Yang et al., 2014). Además, se describió que los LPS producen un aumento en la expresión de LOX-1 en monocitos y células endoteliales (Zhao, Ma, y Chen, 2014). Sin embargo, no se ha estudiado su participación específica en el cáncer colorrectal.

En el presente trabajo se demostró los efectos del LPS y la LDLox sobre la expresión del receptor LOX-1, y a su vez, como su activación, se encuentra relacionada con los procesos de transición epitelio-mesenquimal, migración e invasión en líneas celulares de cáncer colorrectal (COLO320, SW620 y HCT116).

Se determinaron las concentraciones de trabajo de LPS y LDLox a utilizar en este estudio, y se midió el efecto de ambas moléculas sobre la viabilidad celular. El tratamiento con LPS no generó cambios significativos sobre la viabilidad de ninguna de las líneas celulares de cáncer colorrectal ensayadas, en el rango de concentraciones utilizadas (0-30 $\mu\text{g/mL}$). Tampoco se generaron efectos citotóxicos con estas concentraciones. En otros estudios, LPS no aumentó la supervivencia o la proliferación de células de cáncer colorrectal como HT-29 (Rich y Hsu et al., 2011), por lo que nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos previos.

Durante el estudio se observó una respuesta diferencial a los tratamientos de cada línea celular tumoral a concentraciones crecientes de LDLox. Se observó un efecto citotóxico sobre la línea celular COLO320 a concentraciones de 75 µg/mL, sin embargo, en las células SW620 solo se observaron efectos citotóxicos a concentraciones de 150 µg/mL de LDLox, mientras que en las células HCT116 resultó ser resistente a todas las concentraciones utilizadas. Estos resultados se condicen con otros informes en otros tipos de cáncer donde la LDLox muestra un efecto citotóxico diferencial según el tipo celular. Por ejemplo, las líneas celulares K562 / AO2 de leucemia y EC9706 de carcinoma esofágico tratadas con LDLox presentan una mayor tasa de proliferación celular en comparación con células no tumorales tales como las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Li et al., 2013). Igualmente, cuando se cotrataron las células con LPS y LDLox, no observamos ningún efecto sobre la viabilidad de las tres líneas celulares.

En este trabajo, identificamos una expresión basal de LOX-1 en todas las líneas celulares de CCR en estudio, al igual que lo descrito en cáncer mama, cáncer de próstata y cáncer gástrico (Khaidakov y Mehta 2011; González-Chavarría et al. 2014; Murdocca et al. 2016; Li et al. 2017; González-Chavarría et al. 2018) , por lo que resulta esperable que este receptor esté mediando la internalización de LDLox, y sus posibles efectos en la progresión tumoral.

Al estimular las células con LPS, se midió el efecto de concentraciones crecientes en la sobre expresión de LOX-1 y en dos líneas celulares (COLO320 y SW620), observamos un aumento significativo en su expresión. Sin embargo, la línea celular HCT116 no fue sensible al estímulo con LPS, sugiriendo una respuesta diferencial en la expresión de LOX-1. Para las primeras dos líneas celulares, escogimos una concentración fija de lipopolisacárido (5 µg/mL) donde observamos la máxima expresión del receptor, como concentración de trabajo para los siguientes ensayos.

Una posible conexión entre la estimulación celular con LPS y sus efectos proliferativos se puede encontrar en los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR). Se ha informado sobre la participación de TLR4 (un tipo específico de PRR) en la colitis y la progresión del cáncer colorrectal (Fukata et al., 2011). La activación de TLR4 aumenta la inflamación en pacientes con colitis y contribuye a la tumorigénesis (Fukata et al., 2011; Rakhesh et al., 2012). Los LPS estimulan la metástasis en líneas celulares de cáncer colorrectal (HT-29, LS174T, CaCO2, y SW1222) y con ello, inducen un aumento en la migración, la adhesión y la invasión de forma dependiente a TLR4 (Hsu et al., 2011). De la misma forma, nosotros observamos un aumento en la expresión de TLR-4 a las concentraciones de LPS utilizadas en todas las líneas celulares de CCR en estudio, sugiriendo una sensibilidad a LPS dependiente de la activación de TLR-4.

Paralelamente, se analizó el efecto dosis-respuesta de LDLox sobre la expresión del mismo receptor. Observamos que en la línea celular COLO320 la expresión de LOX-1 aumentó significativamente a partir de 25 µg/mL, mientras que para las otras dos líneas, los niveles de expresión del receptor aumentaron a concentraciones más altas (50-100 µg/mL). Se ha visto, el mismo efecto dosis-dependiente en la expresión de *OLR-1* en células de cáncer prostático donde la expresión aumenta a partir de concentraciones de 4 µg/mL de LDLox (Wan et al., 2015). Este efecto de LDLox sobre la expresión de LOX-1, nos indica que se estaría generando una retroalimentación positiva de la expresión del receptor.

Adicionalmente, LPS y LDLox indujeron un aumento significativo en la expresión de LOX-1 en las tres líneas celulares de CCR en el estudio. En las células COLO320, los tratamientos individuales y co-tratamientos favorecen positivamente la expresión del receptor, sin embargo, sin diferencias entre estos estímulos. En la línea celular SW620, en cambio, observamos un aumento en la expresión de LOX-1 con diferencias entre tratamientos individuales y co-tratamientos, donde se potencia la sobre expresión en tratamientos combinados. Por el contrario, en las células HCT116, solo se observó el efecto ejercido por LDLox. Esta respuesta diferencial sobre la expresión de LOX-1 sugiere que en dos de las líneas celulares no se genera un efecto aditivo de los co-tratamientos respecto a la expresión del receptor, mientras que en SW620, sí se ejerce un efecto potenciado por los tratamientos. En estos casos podrían

ocurrir mecanismos similares a lo previamente descrito en células HUVEC, donde el mecanismo de regulación de la expresión de LOX-1 mediado por LPS esta mediado por la sobrerregulación de la expresión de las vías p38/MAPK y p65, mediante la activación de TLR-4 (Zhao, Ma, y Chen, 2014). Por tanto, nuestros resultados refuerzan la idea de que el mecanismo de regulación de la expresión de LOX-1 está mediado por la activación del receptor TLR-4 en la línea celular SW620. Además, se confirman los resultados obtenidos previamente, donde observamos que dos de las líneas celulares de CCR estudiadas (COLO320 y SW620) aumentaron la expresión de TLR-4 al ser estimuladas con LPS. Sobre todo, en las células SW620 se indujo la sobreexpresión de LOX-1 al ser previamente estimuladas con LPS y subsecuentemente activadas con LDLox comparadas con los tratamientos solo con LDLox. En cambio, las células HCT116 al no ser estimuladas previamente con LPS, solo se observó el efecto ejercido por LDLox. Existen más evidencias que apoyan a que este mecanismo descrito en células HUVEC, pueda aplicarse a nuestro modelo, ya que se conoce que en una línea celular de cáncer colorrectal SW480 estimulada con LPS aumenta la fosforilación de la proteína p65, se incrementa la actividad de *NFκB* y la producción de IL-1β y IL-6, lo que favorece la migración e invasión (Rakhesh et al., 2012).

En conjunto, estos resultados nos sugieren que el estímulo con LPS y LDLox favorece la expresión del receptor *scavenger* LOX-1 de forma diferencial en líneas celulares de cáncer colorrectal. Sin embargo, se hace necesario el uso

de controles positivos y negativos para el receptor, con el fin de obtener resultados más concluyentes. La generación de líneas estables que sobreexpresen y silencien LOX-1 utilizando vectores lentivirales, es una propuesta para la generación de estos controles, que ya ha sido previamente utilizada con éxito (González-Chavarría et al., 2014; Murdocca et al., 2016; Li et al., 2017).

Además, evaluamos el efecto de LPS y LDLox sobre marcadores de transición epitelio-mesenquimal. Mediante ensayos de inmunodetección (western blot), se observó que la expresión de E-cadherina disminuyó, mientras que la expresión de vimentina aumentó con los tratamientos combinados (COLO320 y SW620) y además, con el tratamiento con LDLox (HCT116). Con estos resultados sugerimos que el tratamiento combinado LPS/LDLox induce un efecto potenciado en los procesos relacionados a la transición epitelio mesenquimal en dos de las líneas celulares de cáncer colorrectal en estudio (relacionado a la expresión de LOX-1), y que en la línea celular HCT116, la activación por LDLox induce la TEM en estas células.

En los ensayos celulares, el marcador placoglobina solo se vio afectado negativamente en las líneas celulares COLO320 y HCT116 observándose un efecto solo con la combinación (COLO320) y con la combinación y el tratamiento individual con LDLox (HCT116). En esta última línea celular, lo más probable que el efecto ejercido sobre este marcador sea atribuible al tratamiento con LDLox. En otro estudio paralelo, se demostró que la

disminución en la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina y placoglobina) y la mayor expresión de marcadores mesenquimales (N-cadherina y vimentina) ha sido asociado con el desarrollo de cáncer de próstata avanzado y metástasis (Figiel et al., 2017).

En nuestros ensayos de RT-PCR en tiempo real, la expresión del ARN mensajero para vimentina y E-cadherina (*VIM* y *CHD-1*), no mostraron diferencias significativas en la expresión de *VIM* en dos de las líneas celulares, a excepción en HCT116, donde la expresión de este marcador se vio aumentado con la combinación. Sin embargo, la expresión de *CDH-1* disminuyó en las tres líneas celulares en todos los tratamientos, sin diferencias estadísticas entre ellos. Se ha demostrado que la abundancia relativa de una proteína puede o no ocurrir en proporción a sus niveles relativos de ARN mensajero, lo que podría explicar estas diferencias con la expresión de proteínas, que pueden darse debido a que el ARN mensajero es susceptible a modificaciones pos-transcripcionales (Vogel y Marcotte, 2012). Es por esta razón, para obtener resultados más concluyentes, es importante evaluar los procesos relacionados a la TEM en ensayos funcionales.

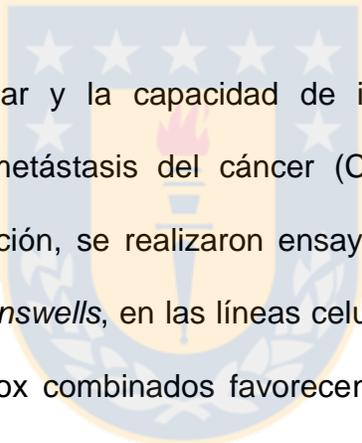
La actividad gelatinasa y expresión de metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9), fue previamente descrita en CCR (Said, Raufman, y Xie, 2014). En nuestros ensayos, observamos que en dos de las líneas de CCR (COLO320 y SW620) la actividad de MMP-9 y MMP-2 aumentó con el tratamiento combinado (LPS y LDLox), lo que estaría relacionado con el

aumento en la capacidad de invasión, y metástasis de las células tratadas, favoreciendo un fenotipo maligno en estas células. Sin embargo, a diferencia de la respuesta de COLO320 y SW620 sobre la actividad de MMP-9 y MMP-2, ninguno de los tratamientos indujo la actividad de metaloproteinasas de matriz en la línea celular HCT116. Por tanto, en concordancia con los resultados obtenidos respecto a los marcadores de transición epitelio-mesenquimal y actividad de metaloproteinasas de matriz, sugerimos que en dos líneas celulares de cáncer colorrectal, los estímulos de LPS y LDLox favorecerían procesos relacionados con la metástasis. Esto concuerda con datos previos de la literatura, donde en un estudio clínico se encontró que los niveles de plasmáticos de MMP-2 y MMP-9 se expresaron en proporciones significativamente más altas en pacientes con CCR en comparación con sujetos sanos (Said, Raufman, y Xie, 2014). Por otro lado, se ha descrito que MMP-7 se encuentra significativamente aumentado en suero de pacientes con cáncer colorrectal (Xing, Xiao-Hu, y Ma, 2014). Sus niveles séricos se encuentran asociados a una menor supervivencia y se correlacionan con la progresión del cáncer (Maurel et al., 2007; Sun et al., 2015). Es por esta razón, que para ampliar nuestros conocimientos acerca del comportamiento del cáncer colorrectal asociado a la expresión de LOX-1 respecto a los procesos de invasión celular, se sugiere estudiar el comportamiento de MMP-7 en nuestras líneas celulares de CCR humano.

En los estudios sobre la formación de colonias de las tres líneas celulares de CCR, observamos que la intensidad de fluorescencia emitida por las colonias aumentó significativamente en dos de las líneas celulares de cáncer colorrectal (COLO320 y HCT116) al ser tratadas con concentraciones crecientes de LDLox. Estos resultados, concuerdan con un informe realizado en una línea celular de cáncer de próstata donde se observó el aumento en el crecimiento de las colonias formadas en células C4-2 tratadas con 100 µg/mL de LDLox (González-Chavarría et al., 2018). Por tanto, la activación de LOX-1 por LDLox podría inducir un proceso tumorigénico relacionado al crecimiento tumoral en diferentes tipos de cáncer. Otras evidencias demuestran el aumento en la proliferación en otra línea celular de cáncer prostático (PC-3) al ser estimuladas con LDLox (Wan et al., 2015). Sin embargo, al tratar previamente las líneas celulares de CCR con LPS y LDLox solo observamos un efecto diferenciado sobre el crecimiento de las colonias en la línea celular HCT116, lo que específicamente en esta línea celular se favorece su potencial tumorigénico.

En otros estudios se demostró que LPS no produce un efecto sobre la proliferación celular en una línea celular de CCR HT-29 (Hsu et al., 2011). A pesar de que otras evidencias demuestran que LPS puede afectar la proliferación en células de cáncer (Huang et al., 2005; He et al., 2007), nosotros no observamos cambios en la proliferación asociada al crecimiento de las colonias en las líneas COLO320 y SW620, durante tratamientos prolongados con LPS y LDLox. Sin embargo, estos resultados no excluyen la capacidad de

las células en estudio para sobrevivir y crecer en el entorno tumoral. De hecho, algunas evaluaciones previas demostraron que los LPS inducen la secreción de citoquinas inmunosupresoras y quimiocinas proangiogénicas (Huang et al., 2005; Wang et al., 2008). También, se describe que en líneas celulares de cáncer de mama existe una asociación entre elevados niveles de proteína *Y-box-binding protein-1* (YB-1) y la inhibición de la proliferación celular, mientras se induce un proceso de transición epitelio-mesenquimal (Evdokimova et al., 2009).



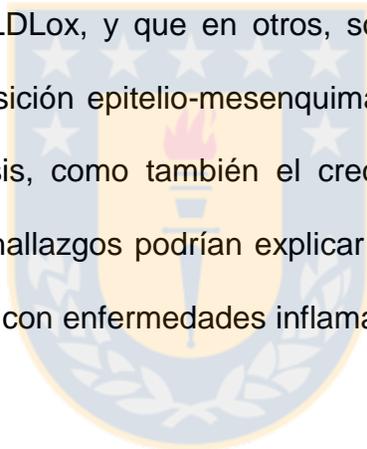
La migración celular y la capacidad de invasión están estrechamente relacionadas con la metástasis del cáncer (Clark y Vignjevic, 2015). Para corroborar esta afirmación, se realizaron ensayos funcionales de migración e invasión celular por *transwells*, en las líneas celulares COLO320 y HCT116. Se observó que LPS/LDLox combinados favorecen los procesos de migración e invasión en la línea celular COLO320, no obstante, los mismos tratamientos solo favorecieron la migración de la línea celular HCT116. Estos datos sugerirían que LOX-1 posiblemente podría estar participando en otros procesos celulares y no en la invasión de este tipo celular. De acuerdo a la expresión del receptor LOX-1, similar a los resultados obtenidos en este trabajo, en células de cáncer gástrico se observó mediante ensayos de migración un aumento de más de tres veces en este proceso en las células que sobreexpresaron LOX-1, mientras que la migración disminuyó en las mismas células donde LOX-1 fue silenciado (Li et al., 2017). Además, se ha documentado mediante ensayos de

cierre de la herida, que el silenciamiento de LOX-1 por ARN de interferencia disminuye la migración de células de cáncer colorrectal (DLD1) (Murdocca et al., 2016).

Los resultados obtenidos en las células de cáncer colorrectal humano estudiadas, muestran que en las tres líneas celulares LPS y/o LDLox inducen la sobreexpresión de LOX-1 de manera diferencial a la estimulación. En la línea celular COLO320 la inducción y activación de LOX-1 por LPS y LDLox combinados, favorece la transición epitelio-mesenquimal, la actividad de metaloproteinasas de matriz-2 y 9, y los procesos de migración e invasión relacionados con la metástasis. Mientras que, en la línea celular SW620 el efecto potenciado producido por la combinación LPS/LDLox indujo un aumento en la expresión del receptor comparado con el estímulo de LDLox. Este evento, favoreció la expresión de marcadores de transición epitelio-mesenquimal y la actividad de metaloproteinasas de matriz. Sin embargo, no fue posible realizar los ensayos funcionales en esta línea celular. Por otro lado, respecto a la expresión de LOX-1, la línea celular HCT116, solo fue sensible al estímulo con LDLox y el efecto sobre la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal (vimentina y plakoglobina) posiblemente sea atribuible a este efecto. Las células HCT116, a diferencia de las otras dos líneas, al ser estimuladas con LPS y LDLox aumentan el crecimiento en forma colonias de la misma forma que los tratamientos con LDLox, sugiriendo que estas células adquieren la capacidad de inducir un proceso tumorigénico relacionado a la

proliferación. Adicionalmente, los estímulos solo favorecieron la migración celular, no así, la actividad de metaloproteinasas de matriz, ni tampoco el potencial de invasión de estas células.

Como conclusión de este trabajo, se demostró que LOX-1 se expresa basalmente en tres líneas celulares de cáncer colorrectal y se sobreexpresa en células de cáncer colorrectal con el estímulo de LPS y LDLox de manera diferencial en cada línea celular. Se sugiere que en algunos casos, el co-tratamiento con LPS/LDLox, y que en otros, solo LDLox promueve procesos relacionados a la transición epitelio-mesenquimal, migración e invasión celular asociados a metástasis, como también el crecimiento celular asociado a la tumorigénesis. Estos hallazgos podrían explicar el riesgo de cáncer colorrectal en personas obesas o con enfermedades inflamatorias intestinales, y su posible asociación entre ellas.



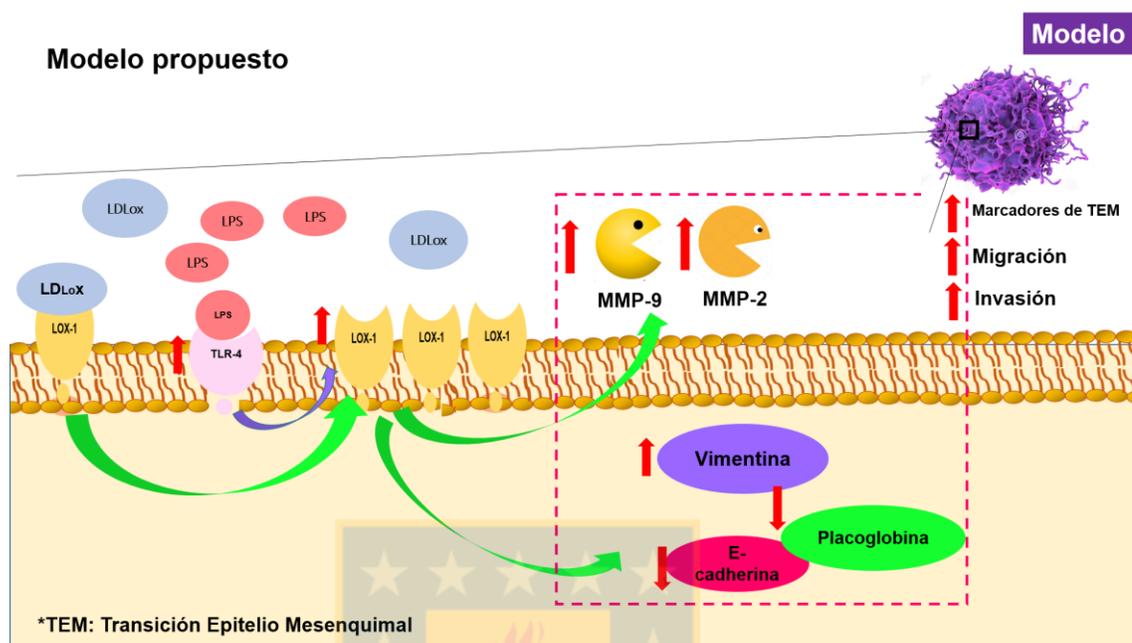


Figura 14: Modelo de activación por LDLox e inducción con LPS sobre receptor scavenger y su relación en la progresión tumoral. (Fuente: Elaboración propia).

7 BIBLIOGRAFÍA

- Al-Sukhni, Wigdan., Aronson, M. y Gallinger, S. (2008). Hereditary Colorectal Cancer Syndromes: Familial Adenomatous Polyposis and Lynch Syndrome. *Surgical Clinics of North America*. 88(4): 819-44.
- Alaseema, A., Alhazzania K., Dondapatia, P., Alobida, S., Bishayeee, A. y Rathinavelu, A. (2017). Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. *Seminars in Cancer Biology* 579(17) 30184-0.
- Aldapa-Vega, G., Pastelín-Palacios, R., Isibasi, A., Moreno-Eutimio, M. y López-Macías, C. (2016). Modulación de la respuesta inmune por los lipopolisacáridos bacterianos. *Revista Alergia México*, 63(3): 293.
- Andoh, A., Imaeda, H., Aomatsu, T., Inatomi, O., Bamba, S., Sasaki, M., Saito, Y., Tsujikawa, T. y Fujiyama Y. (2011). Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Gastroenterology* 46(4): 479–86.
- Aoyama, T, Fujiwara, H., Masaki, T. y Sawamura, T. (1999). Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 31(12): 2101–14.
- Arends, M. (2013). Pathways of colorectal carcinogenesis. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 21(2): 97–102.
- Baars, J., Kuipers, E., Van Haastert, M., Nicolai, J., Poen, A. y Van der Woude, C. (2012). Age at diagnosis of inflammatory bowel disease influences early development of colorectal cancer in inflammatory bowel disease patients: A nationwide, long-term survey. *Journal of Gastroenterology* 47(12): 1308–22.
- Baranwal, S. y Alahari, S. (2009). Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384(1): 6–11.
- Bauer, G. (2014). Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells. *Anticancer Research* 34(4): 1467–82.

- Silvia Biocca, S., Filesi, I., Mango, R., Maggiore, L., Baldini, F., Vecchione, L., Viola, A., Citro, G., Federici, G., Romeo, F. y Novelli, G. (2008). The splice variant LOXIN inhibits LOX-1 receptor function through hetero-oligomerization. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44(3): 561–70.
- Calle, E. y Thun, M. (2004). Obesity and cancer. *Oncogene* 23(38): 6365–78.
- Canavan, C., Abrams, K. y Mayberry, J. (2006). Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23(8): 1097–1104.
- Cao, W., Calabro, V., Root, A., Yan, G., Lam, K., Olland, S., Sanford, J., Robak, A., Zollner, R., Lu, Z., Ait-Zahra, M., Agostinelli, R., Tchistiakova L., Gill, D., Harnish, D., Paulsen, J. y Shih, H. (2009). Oligomerization is required for the activity of recombinant soluble LOX-1. *FEBS Journal* 276(17): 4909–20.
- Sánchez, C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 24(4) 553-62.
- Chan, A., Jim, M., Lam, K., Morris, J., Siu, D., Tong, T., Ng, F., Wong, S., et al. (2007). Prevalence of Colorectal Neoplasm Among Patients With Newly Diagnosed Coronary Artery Disease. *JAMA* 298(12): 1412-19.
- Chen, K., Liao, Y., Wang, J., Lin, Y., Chen, C., Juo, S. (2015). Oxidized low-density lipoprotein is a common risk factor for cardiovascular diseases and gastroenterological cancers via epigenomical regulation of microRNA-210. *Oncotarget* 6(27): 24105–18.
- Clark, A. y Vignjevic, D. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology* 36: 13–22.
- Condamine, T., Dominguez, G., Youn, J., Kossenkov, A., Mony, S., Alicea-Torres, K., Tcyganov, E., Hashimoto, A. et al. (2016). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Science Immunology* 1(2): aaf8943-aaf8943.
- Crespo-Sanjuán, J., Calvo-Nieves, M., Aguirre-Gervás, B., Herreros-Rodríguez, J., Velayos-Jiménez, B., Castro-Alija, M., Muñoz-Moreno, M., Sánchez, D. et al. (2015). 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. *Laboratory Medicine* 46(2): 123–35.
- Curtin, K., Wolff, R., Herrick, J., Abo, R. y Slattery, M. (2010). Exploring multilocus associations of inflammation genes and colorectal cancer risk using hapConstructor. *BMC Medical Genetics* 11(1): 170.
- D'Angelica, M. (2013). Staging stage IV colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology* 20(7): 2106–7.
- Dandapat, A., Hu, C., Sun, L. y Mehta, J. (2007). Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(11): 2435–42.
- Danese, S., y Mantovani, A. (2010). Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: A paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* 29(23): 3313–23.
- Delimaris, I., Faviou, E., Antonakos, G., Stathopoulou, E., Zachari, A. y Dionyssiou-Asteriou, A. (2007). Oxidized LDL, serum oxidizability and serum lipid levels in patients with breast or ovarian cancer. *Clinical Biochemistry* 40(15): 1129–34.
- Diakowska, D., Grabowski, K., Nienartowicz, M., Zarwbski, P., Fudalej, K y Markocka-Mdczka, K. (2015). Circulating oxidized low-density lipoproteins and antibodies against oxidized low-density lipoproteins as potential biomarkers of colorectal cancer. *Gastroenterology Research and Practice* 2015.
- Van Duijnhoven, F., Bueno-De-Mesquita, H., Calligaro, M., Jenab, M., Pischon, T., Jansen, E., Frohlich, J., Ayyobi, A., et al. (2011). Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Gut* 60(8): 1094–1102.
- Dukes, C. (1932). The classification of cancer of the rectum. *Journal of Pathological Bacteriology* 23(8): 605–11.
- Dulal, S. y Keku, T. (2014). Gut microbiome and colorectal adenomas. *Cancer J* 20(3): 225–31.
- Edge, S. y Compton, C. (2010). The american joint committee on cancer: The

- 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology* 17(6): 1471–74.
- Andreas, E y Mikulits, W. (2005). Models of epithelial-mesenchymal transition. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2(1): 57–63.
- Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J y Flavell, R. (2011). Regulation of the Antimicrobial Response by NLR Proteins. *Immunity* 34(5): 665–79.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Andre, J., Scheen, J., Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 105(2): 141–50.
- Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T. y Sorensen, P. (2009). Reduced proliferation and enhanced migration: Two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. *Cell Cycle* 8(18): 2901–6.
- Falconi, M., Biocca, S., Novelli, G. y Desideri, A. (2007). Molecular dynamics simulation of human LOX-1 provides an explanation for the lack of OxLDL binding to the Trp150Ala mutant. *BMC Structural Biology* 7(7): 1–11.
- Fearon, E. y Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759–67.
- Fiaschi, T. y Chiarugi, P. (2012). Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. *International Journal of Cell Biology* 2012.
- Figiel, S., Vasseur, C., Bruyere, F., Rozet, F., Maheo, K. y Fromont, G. (2017). Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. *Human Pathology* 61: 26–32.
- Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R., Barregard, L., Bhutta, Z., Brenner, H., Dicker, D., Chimed-Orchir, O., et al. (2017). Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden. *JAMA Oncology* 3(4): 524–48.
- Fukata, M., Shang, L., Santaolalla, R., Sotolongo, J., Pastorini, C., España, C., Ungaro, R., Harpaz, N., et al. (2011). Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives

- colitis-associated tumorigenesis. *Inflammatory Bowel Diseases* 17(7): 1464–73.
- Fukata, M. y Abreu, M. (2009). Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Current Opinion in Pharmacology* 9(6): 680–87.
- Fukata, M., Vamadevan, A. y Abreu, M. (2009). Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Seminars in Immunology* 21(4): 242–53.
- Giovannucci, E. (2007). Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition* 86(3): 836S–842S.
- González-Chavarría, I., Fernández, E., Gutiérrez, N., González-Horta, E., Sandoval, F., Cifuentes, P., Castillo, C., Cerro, R., Sanchez, O. y Toledo, J. (2018). LOX-1 activation by oxLDL triggers an epithelial mesenchymal transition and promotes tumorigenic potential in prostate cancer cells. *Cancer Letters* 414: 34–43.
- González-Chavarría, I., Cerro, R., Parra, N., Sandoval, F., Zuñiga, F., Omazábal, V., Lamperti, L., Jiménez, S., et al. (2014). Lectin-Like Oxidized LDL Receptor-1 Is an Enhancer of Tumor Angiogenesis in Human Prostate Cancer Cells *PLoS ONE* 9(8): e106219.
- Grady, W. y Carethers, J. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 135(4): 1079–99.
- Gregor, M. y Hotamisligil, G. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology* 29(1): 415–45.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57–70.
- Hanahan, Douglas. y Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5): 646–74.
- Handbooks, Iarc, y Cancer Prevention. 2002. *Control Weight control and physical activity*.
- García, H., Marina, O., Rodríguez, L., García, E. y Vázquez, M. (2011). Factores de riesgo para el cáncer colorrectal. *Revista Cubana de Medicina* 50(2): 118–32.

- Haq, A., Schneeweiss, J., Kalsi, V. y Arya, M. (2009). The Dukes staging system: a cornerstone in the clinical management of colorectal cancer. *The Lancet Oncology* 10(11): 1128.
- Hea, W., Liu, Q., Wei, L., Li, C. y Cao, X. (2007). TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Molecular Immunology* 44(11): 2850–59.
- Hew, M., Bhavsar, P., Torrego, A., Meah, S., Khorasani, N., Barnes, P., Adcock, I. y Chung, K. (2006). Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174(2): 134–41.
- Hewitson, P., Glasziou, P., Watson, E., Towler, B. y Irwig, L. (2008). Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (Hemoccult): An update. *American Journal of Gastroenterology* 103(6): 1541–49.
- Hirsch, H., Iliopoulos, D., Joshi, A., Zhang, Y., Jaeger, S., Bulyk, M., Tschlis, P., Liu, S. y Struhl, K. (2010). A Transcriptional Signature and Common Gene Networks Link Cancer with Lipid Metabolism and Diverse Human Diseases. *Cancer Cell* 17(4): 348–61.
- Hsu, P., Wang, B., Huang, C., Wu, Y. y Hsu, W. (2011). Prognostic Factors for Post-recurrence Survival in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients with Recurrence after Resection. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 15(4): 558–65.
- Hsu, R., Chan, C., Spicer, J., Rousseau, M., Giannias, B., Rousseau, S. y Ferri, L. (2011). LPS-Induced TLR4 Signaling in Human Colorectal Cancer Cells Increases α 1 Integrin-Mediated Cell Adhesion and Liver Metastasis. *Cancer Research* 71(5): 1989–98.
- Hu, C., Dandapat, A. y Mehta, J. (2007). Angiotensin II Induces Capillary Formation From Endothelial Cells Via the LOX-1 Dependent Redox-Sensitive Pathway. *Hypertension* 50(5): 952–57.
- Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K., Chen, Y., Mayer, L., Unkeless, J. y Xiong, H. (2005). Toll-Like Receptors on Tumor Cells Facilitate Evasion of Immune Surveillance Toll-Like Receptors on Tumor Cells Facilitate Evasion of Immune Surveillance. *Cancer Res* (12): 5009–14.

- Hugh, T., Dillon, S., Taylor, B., Pignatelli, M., Poston, G. y Kinsella, A. (1999). Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: A survival analysis. *British Journal of Cancer* 80(7): 1046–51.
- Ikebe, M., Kitaura, Y., Nakamura, M., Tanaka, H., Yamasaki, A., Nagai, S., Wada, J., Yanai, K., Koga, K., Sato, N., Kubo, M., Tanaka, M., Onishi, H. y Katano, M. (2009). Lipopolysaccharide (LPS) increases the invasive ability of pancreatic cancer cells through the TLR4/MyD88 signaling pathway. *Journal of Surgical Oncology* 100(8): 725–31.
- Instituto Nacional de Cáncer. 2015. “¿ Qué es el cáncer?” *Tipos de cáncer [Última actualización: 9 de febrero 2015, Acceso 11 de diciembre 2015]:* 1–6.
- International Agency for Research on Cancer. “Globocan 2012 - Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012”. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (30 de julio de 2018).
- Iwatsuki, M., Mimori, K., Yokobori, T., Ishi, H., Beppu, T., Nakamori, S., Baba, H. y Mori, M. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Science* 101(2): 293–99.
- Johnson, C., Wei, C., Ensor, J., Smolenski, D., Amos, C., Levin, B. y Berry, D. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes & Control* 24(6): 1207–22.
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R., Duerr, R., McGovern, D., Hui, K., Lee, J., Schumm, L., Sharma, Y., Anderson, C., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K. y Cleynen, I. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491(7422): 119–24.
- Kanauchi, O., Mitsuyama, K. y Andoh, A. (2013). The new prophylactic strategy for colon cancer in inflammatory bowel disease by modulating microbiota. *Scandinavian journal of gastroenterology* 48(4): 387–400.
- Kelesidis, I., Kelesidis, T. y Mantzoros, C. (2006). Adiponectin and cancer: A systematic review. *British Journal of Cancer* 94(9): 1221–25.
- Keshavarzian, A., Zapeda, D., List, T. y Mobarhan, S. (1992). High levels of reactive oxygen metabolites in colon cancer tissue: analysis by chemiluminescence probe. *Nutrition and cancer* 17(3): 243–49.
- Khaidakov, M. y Mehta, J. (2011). Do atherosclerosis and obesity-associated

susceptibility to cancer share causative link to oxLDL and LOX-1?. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 25(5): 477–87.

- Knutson, C., Mangericha, A., Zenga, Y., Raczynskia, A., Libermana, R., Kanga, P., Yea, W., Prestwicha, E., Lua, K., Wishnoka, J., Korzenikc, J., Wogana, G., Foxa, J., Dedona, P. y Tannenbaum, S. (2013). Chemical and cytokine features of innate immunity characterize serum and tissue profiles in inflammatory bowel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(26): E2332–41.
- Kojima, M., Morisaki, T., Izuhara, K., Uchiyama, A., Matsunari, Y., Katano, M. y Tanaka, M. (2000). Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation. *Oncogene* 19(9): 1225–31.
- Kuipers, E., Grady, W., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J., Boelens, P., van de Velde, C. y Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*: 1: 15065.
- Lazarova, D., Lee, A., Wong, T., Marian, B., Chiaro, C., Rainey, C., Bordonaro, M. (2014). Modulation of wnt activity and cell physiology by butyrate in LT97 microadenoma cells. *Journal of Cancer* 5(3): 203–13.
- Li, C., Zhang, J., Wu, H., Li, L., Yang, C., Song, S., Peng, P., Shao, M., Zhang, M., Zhao, J., Zhao, R., Wu, W., Ruan, Y., Wang, L. y Gu, J. (2017). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 facilitates metastasis of gastric cancer through driving epithelial-mesenchymal transition and PI3K/Akt/GSK3 β activation. *Scientific Reports* 7: 1–12.
- Li, H., Li, X., Ma, Q. y Cui, J. (2013). The Variability of oxLDL-induced Cytotoxicity on Different Types of Cell Lines. *Cell Biochemistry and Biophysics* 67(2): 635–44.
- Li, Y., Zhang, Q., Chen, Z., He, Z. y Yi, G. (2015). Oxidized low-density lipoprotein attenuated desmoglein 1 and desmocollin 2 expression via LOX-1/Ca²⁺/PKC- β signal in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468(1–2): 380–86.
- Liang, M., Zhang, P. y Fu, J. (2007). Up-regulation of LOX-1 expression by TNF- α promotes trans-endothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Letters* 258(1): 31–37.
- Liu, C, Lin, H., Tang, M. y Wang, Y. (2015). Vimentin contributes to epithelial-

mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* 6(18): 15966–83.

- Liu, Z., Brooks, R., Ciappioa, E., Kimd, S., Crotta, J., Bennettb, G., Greenberg, A. y Mason, J. (2012). Diet-induced obesity elevates colonic TNF- α in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: A mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23(10): 1207–13.
- Lorincz, A. y Sukumar, S. (2006). Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13(2): 279–92.
- Lu, J., Mitra, S., Wang, X., Khaidakov, M. y Mehta, J. (2011). Oxidative Stress and Lectin-Like ox-LDL-Receptor LOX-1 in Atherogenesis and Tumorigenesis. *Antioxidants & Redox Signaling* 15(8): 2301–33.
- Mantovani, A., Allavena, P. Sica, A. y Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203): 436–44.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D. y Garcia-Gil, L. (2006). Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflammatory Bowel Diseases* 12(12): 1136–45.
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J., Blanco, J., Garcia-Gil, J. y Darfeuille-Michaud, A. (2009). Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 15(6): 872–82.
- Maurel, J., Nadal, C., Garcia-Albeniz, X., Gallego, R., Carcereny, E., Almendro, V., Mármol, M., Gallardo, E., Augé, J., Longarón, R., Martínez-Fernandez, A., Molina, R., Castells, A. y Gascón, P. (2007). Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* 121(5): 1066–71.
- Mayer, L. (2010). Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *Journal of Gastroenterology* 45(1): 9–16.
- Mazlam, M. y Hodgson, H. (1992). Peripheral blood monocyte cytokine production and acute phase response in inflammatory bowel disease. *Gut* 33(6): 773–78.

- Medina, E. y Kaempffer, A. (2001). Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations. *Revista medica de Chile* 129(10): 1195–1202.
- Mehta, J., Chen, J., Hermonat, P., Romeo, F. y Novelli, G. (2006). Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): A critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovascular Research* 69(1): 36–45.
- Miller, T., Isenberg, J. y Roberts, D. (2009). Molecular Regulation of Tumor Angiogenesis and Perfusion via Redox Signaling. *Chemical Reviews* 109(7): 3099–3124.
- Moghaddam, A., Woodward, M. y Huxley, R. (2007). Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of 31 Studies with 70,000 Events. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16(12): 2533–47.
- Morgan, X., Tickle, T., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K., Ward, D., Reyes, J., Shah, S., LeLeiko, N., Snapper, S., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B., Xavier, R. y Huttenhower. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology* 13(9): R79.
- Murdocca, M., Mango, R., Pucci, S., Biocca, S., Testa, B., Capuano, R., Paolesse, R., Sanchez, M., Orlandi, A., di Natale, C., Novelli, G. y Sangiuolo, F. (2016). The lectin-like oxidized LDL receptor-1: a new potential molecular target in colorectal cancer. *Oncotarget* 7(12).
- Nakamura, Y., Nishisho, I., Kinzler, K., Vogelstein, B., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H. y Horii, A. (1992). Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene in FAP (familial polyposis coli) patients and in sporadic colorectal tumors. *The Tohoku journal of experimental medicine* 168(2): 141–47.
- Nakashima, H., Nakamura, M., Yamaguchi, H., Yamanaka, N., Akiyoshi, T., Koga, K., Yamaguchi, K., Tsuneyoshi, M., Tanaka, M. y Katano, M. (2006). Nuclear Factor- κ B Contributes to Hedgehog Signaling Pathway Activation through Sonic Hedgehog Induction in Pancreatic Cancer. *Cancer Research* 66(14): 7041–49.
- Ohki, I., Ishigaki, T., Oyama, T., Matsunaga, S., Xie, Q., Ohnishi-Kameyama, M., Murata, T., Tsuchiya, D., Machida, S., Morikawa, K. y Tate, S. (2005). Crystal Structure of Human Lectin-like, Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 Ligand Binding Domain and Its Ligand Recognition Mode to oxLDL. *Structure* 13(6): 905–17.

- Ohki, I., Amida, H., Yamada, R., Sugihara, M., Ishigaki, T. y Tate, S. (2011). Surface plasmon resonance study on functional significance of clustered organization of lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1814(2): 345–54.
- Organización mundial de la salud (2018). “Organización Mundial de la Salud”. <http://www.who.int/es> (30 de julio de 2018).
- O’Connor, Pamela M., Tamia K. Lapointe, Paul L. Beck, y Andre G. Buret. 2010. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 16(8): 1411–20.
- Pang, T., Wang, J., Benicky, J. y Saavedra, J. (2012). Minocycline ameliorates LPS-induced inflammation in human monocytes by novel mechanisms including LOX-1, Nur77 and LITAF inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects* 1820(4): 503–10.
- Park, H., Adsit, F. y Boyington, J. (2005). The 1.4 Å Crystal Structure of the Human Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor Lox-1. *Journal of Biological Chemistry* 280(14): 13593–99.
- Parlato, S., Romagnoli, G., Spadaro, F., Canini, I., Sirabella, P., Borghi, P., Ramoni, C., Filesi, I., Biocca, S., Gabriele, L. y Belardelli, F. (2010). LOX-1 as a natural IFN-mediated signal for apoptotic cell uptake and antigen presentation in dendritic cells. *Blood* 115(8): 1554–63.
- Pischon, T., Nöthlings, U. y Boeing, H. (2008). Obesity and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society* 67(02): 128–45.
- Poynter, J., Gruber, S., Higgins, P., Almog, R., Bonner, J., Rennert, H., Low, M., Greenson, J. y Rennert, G. (2005). Statins and the Risk of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 352(21): 2184–92.
- Prorok-Hamon, M., Friswell, M., Alswied, A., Roberts, C., Song, F., Flanagan, P., Knight, P., Codling, C., Marchesi, J., Winstanley, C., Hall, N., Rhodes, J. y Campbell, B. (2014). Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ Escherichia coli expressing IpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* 63(5): 761–70.
- Rakhesh, M., Cate, M., Vijay, R., Shrikant, A. y Shanjana, A. (2012). A TLR4-interacting peptide inhibits lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses, migration and invasion of colon cancer SW480 cells. *OncImmunology* 1(9): 1495–1506.

- Ruder, E., Laiyemo, A., Graubard, B., Hollenbeck, A., Schatzkin, A. y Cross, A. (2011). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Colorectal Cancer Risk in a Large, Prospective Cohort. *The American Journal of Gastroenterology* 106(7): 1340–50.
- Rutter, M. (2004). Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. *Gut* 53(12): 1813–16.
- Said, A., Raufman, J. y Xie, G. (2014). The Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Cancers* 6(1): 366–75.
- Sartor, R. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 134(2): 577–94.
- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawua, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T. y Masaki, T. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386(6620): 73–77.
- Simiantonaki, N., Kurzik-Dumke, U., Karyofylli, G., Jayasinghe, C., Michel-Schmidt, R. y Kirkpatrick, C. (2007). Reduced expression of TLR4 is associated with the metastatic status of human colorectal cancer. *International Journal of Molecular Medicine* 20(1): 21–29.
- Sobhani, I., Tapm J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J., Letulle, S., Langella, P., Corthier, G., Tran Van Nhieu, J. y Furet, J. (2011). Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *PLoS ONE* 6(1): e16393.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P. y Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(43): 16731–36.
- Song, M., Garrett, W. y Chan, A. (2015). Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology* 148(6): 1244–1260.e16.
- Sun, D., Zhang, Y., Qi, Y., Zhou, X. y Lv, G. (2015). Prognostic significance of MMP-7 expression in colorectal cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology* 39(2): 135–42.

- Suzuki, K., Ito, Y., Wakai, K., Kawado, M., Hashimoto, S., Toyoshima, H., Kojima, M., Tokudome, S., Hayakawa, N., Watanabe, Y., Tamakoshi, K., Suzuki, S., Ozasa, K. y Tamakoshi, A. (2004). Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: a case-control study nested in the Japan Collaborative Cohort Study. *American Association for Cancer Research Research* 13(11 Pt 1): 1781–87.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. y Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* 138(6): 2101–2114.e5.
- Uronis, J., Mühlbauer, M., Herfarth, H., Rubinas, T., Jones, G. y Jobin, C. (2009). Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility *PLoS ONE* 4(6): e6026.
- Vance, J. y Vance, D. (2008). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. ISBN: 9780444511393.
- Vogel, C. y Marcotte, E. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 13(4): 227–32.
- Wan, F., Qin, X., Zhang, G., Lu, X., Zhu, Y., Zhang, H., Dai, B., Shi, G. y Ye, D. (2015). Oxidized low-density lipoprotein is associated with advanced-stage prostate cancer. *Tumor Biology* 36(5): 3573–82.
- Wang, L., Liu, Q., Sun, Q., Zhang, C., Chen, T. y Cao, X. (2008). TLR4 signaling in cancer cells promotes chemoattraction of immature dendritic cells via autocrine CCL20. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366(3): 852–56.
- West, N., McCuaig, S., Franchini, F. y Powrie, F. (2015). Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology* 15(10): 615–29.
- White, R. (1998). Tumor Suppressing Pathways. *Cell* 92(5): 591–92.
- Xing, X., Xiao-Hu, G. y Fei Ma, T. (2014). Relationship of serum mmp-7 levels for colorectal cancer: A meta-analysis. *Tumor Biology* 35(10): 10515–22.
- Xu, S., Liu, Z., Huang, Y., Le, K., Tang, F., Huang, H., Ogura, S., Little, P., Shen, X. y Liu, P. (2012). Tanshinone II-A inhibits oxidized LDL-induced LOX-1 expression in macrophages by reducing intracellular superoxide radical generation and NF- κ B activation. *Translational Research* 160(2):

114–24.

- Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T. y Kodama, T. (1998). Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 54(7): 628–40.
- Yang, H., Wang, B., Wang, T., Xu, L., He, C., Wen, H., Yan, J., Su, H. y Zhu, X. (2014). Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Overexpressed in Patients with Lymph Node Metastasis *PLoS ONE* 9(10): e109980.
- Yao, X. y Tian, Z. (2014). Dyslipidemia and colorectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Cancer causes control* 26(2): 257-68.
- Ying, J., Zhou, H., Liu, P., You, Q., Kuang, F., Shen, Y. y Hu, Z. (2018). Aspirin inhibited the metastasis of colon cancer cells by inhibiting the expression of toll-like receptor 4. *Cell & Bioscience* 8(1): 1.
- Yoshimoto, R., Fujita, Y., Kakino, A., Iwamoto, S., Takaya, T. y Sawamura, T. (2011). The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 25(5): 379–91.
- Zhang, X., Wu, W. y Yu, J. (2016). Obesity and Cancer. *Obesity*: 211–20.
- Zhao, W., Ma, G. y Chen, X. (2014). Lipopolysaccharide induced LOX-1 expression via TLR4/MyD88/ROS activated p38MAPK-NF-κB pathway. *Vascular Pharmacology* 63(3): 162–72.
- Van Z., Krupitza, F. y Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 728(1–2): 23–34.

8 ANEXOS

8.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO DONACIÓN DE SANGRE.

Estimado paciente a través de este documento se le invita a participar en forma voluntaria de un estudio titulado: “INDUCCIÓN DE LOX-1 POR LPS BATERIANO Y SU ASOCIACIÓN EN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN CÁNCER COLORRECTAL HUMANO”

Esta investigación tiene como finalidad el estudio de un marcador que relacione a la obesidad y enfermedades inflamatorias intestinales con la progresión del cáncer colorrectal humano. Para ello será necesario la toma de muestra de sangre de sujetos sanos para la obtención de colesterol LDL y su subsecuente oxidación.

En qué consiste: Al paciente se le extraerá una muestra de sangre venosa obtenida por una enfermera mediante un sistema de tubos estériles al vacío, bajo un procedimiento estandarizado. En total se obtendrá un máximo de 50 mL en tres tubos.

Riesgos del procedimiento: Los inconvenientes, riesgos y/o complicaciones son: en algunos casos sensación de mareo. Casualmente puede haber un leve sangramiento que deberá pasar dentro de los primeros minutos y en muy pocos casos existe riesgo leve de formar un pequeño moretón que pasará en dos días aproximadamente. Puede quedar una sensación de dolor que pasará en los primeros minutos.

ANTES DE OTORGAR SU CONSENTIMIENTO ACLARE SUS DUDAS

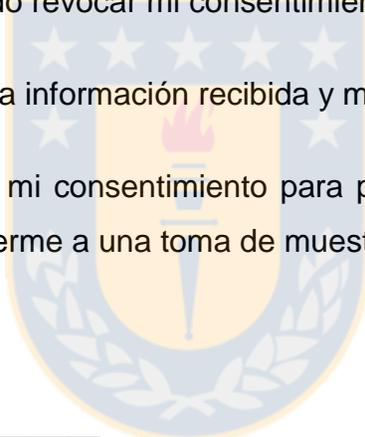
Estimados pacientes, le invitamos a participar de esta investigación su consentimiento es completamente voluntario y su negativa no tendrá ninguna repercusión.

Si después de iniciado el estudio, usted desea retirarse, lo puede hacer sin necesidad de dar ninguna explicación.

Declaro que he sido informado por el investigador acerca del estudio en el que participaré, sus procedimientos y sus riesgos. Me han explicado las posibles alternativas y que puedo revocar mi consentimiento antes que sea realizado.

Estoy **satisfecho** con la información recibida y mis dudas han sido aclaradas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para participar del estudio, contestar las encuestas y someterme a una toma de muestra de sangre.



Firma del Paciente o representante legal

RUN:

Firma del Investigador

RUN:

Firma del Director del departamento o un representante

RUN:

Concepción,.....de.....de.....

8.2 PROTOCOLO MANIPULACIÓN DE MATERIALES Y DESECHOS.

A. USO DE ELEMENTOS CON POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO.

En la investigación propuesta se utilizaron tres líneas celulares de cáncer colorrectal (COLO320, SW620 y HCT116) que suponen un potencial riesgo biológico. Las células de cáncer colorrectal humano fueron manejadas utilizando doble guante, por personas con más de 5 años de experiencia en cultivo celular. Las células se manejaron en un gabinete de bioseguridad nivel 2 y el material fungible contaminado se irradió 30 minutos con luz UV y/o cloro antes de ser desechado.

A.1 Procedimientos para su manejo y desecho.

Las líneas celulares se manejaron por personal entrenado en cultivo celular, para lo cual se descongelaron viales con células mantenidas en nitrógeno líquido, fueron sub-cultivadas en frascos de cultivo en estufa destinada a cultivos de líneas celulares. Todos los materiales contaminados con estas células fueron desechados en recipientes especiales (MATPEL) previo tratamiento por 30 minutos con luz UV.

A.2 Infraestructura y equipos de protección personal utilizados durante la investigación.

Se dispuso de una sala de cultivo para líneas celulares con gabinete de seguridad biológica de clase 2, estufa a 37°C para el cultivo único de líneas celulares, tanques de nitrógeno líquido para la preservación de las líneas. Se utilizaron guantes de látex dobles, delantal y mascarilla como medidas de seguridad.

B. USO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS.

Tabla 5. Procedimiento de manejo y desecho de sustancias químicas.

Sustancia	Grado de riesgo	Tipo de riesgo	Procedimiento de manejo y desecho
LPS	2	Salud/Irritable	Su manejo se realizó de forma de evitar su contacto con la piel y mucosas, trabajando con guantes bajo campana. Se evitó su contacto con fuentes de ignición. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL sin previo tratamiento.
DMSO	1	Salud/Inflamable	Su manejo se realizó de forma de evitar su contacto con la piel y mucosas, trabajando con guantes bajo campana. Se evitó también su contacto con fuentes de ignición. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL sin previo tratamiento.
2-Mercapto etanol	2	Salud-22	Su manejo se realizó de forma de evitar su ingestión o inhalación trabajando con guantes bajo campana. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL sin previo tratamiento.
Paraformald e-hído	2	Salud-10-22	Su manejo se realizó de forma de evitar su contacto con la piel y mucosas, trabajando con guantes bajo campana. Se evitó también su contacto con fuentes de ignición. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL sin previo tratamiento.
Bromuro	2	Salud/Inflamable-	Su manejo se realizó de forma de evitar

de Etidio		-33- 37/38-40	su contacto con la piel y mucosas, trabajando con guantes bajo campana. Se evitó su contacto con fuentes de ignición. Los materiales contaminados fueron de uso exclusivo para este fin. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL sin previo tratamiento.
Lauril sulfato (SDS)	2	Salud	Su manejo se realizó de forma de evitar su contacto con la piel y mucosas, trabajando con guantes bajo campana. Se evitó también su contacto con fuentes de ignición. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL sin previo tratamiento.
Isopropanol	3	Inflamable-11	Su manejo se realizó de forma de evitar su contacto con fuentes de ignición. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL sin previo tratamiento.
Acilamida	3	Salud 23-33	Su manejo se realizó de forma de evitar su contacto Con la piel y mucosas, trabajando con delantal y guantes. Su preparación se realizó en recipientes desechables o fueron de uso exclusivo para esta sustancia. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL previa polimerización.
Alcohol etílico	3	Inflamable-11	Su manejo se realizó de forma de evitar su contacto con fuentes de ignición. Se desechó en recipientes dispuestos por MATPEL sin previo tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.

B.1 Infraestructura y equipos de protección personal utilizados durante la investigación.

Se dispuso de gabinetes de bioseguridad clase I y II para la manipulación de las sustancias antes indicadas, recipientes de desechos según naturaleza química y reactividad dispuestos por la empresa de manejo de residuos químicos y biológicos de la Universidad de Concepción (MATPEL). En equipos personales, existe la obligatoriedad del uso de delantal en el laboratorio, se dispuso de guantes de látex, mascarilla, anti-parras, equipos de emergencia para lavado de ojos, equipamiento de contención de derrames de sustancias peligrosas.

C. USO DE MATERIAL CORTOPUNZANTE O MATERIAL DE VIDRIO QUE PUEDA GENERAR MATERIAL CORTOPUNZANTE.

C.1 Procedimientos que usó para manejarlos y desecharlos.

Se utilizaron pipetas pasteur de vidrio para dispersar material biológico bacteriano antes indicado. Una vez utilizadas ambas fueron desechadas en recipientes especiales dispuestos por MATPEL.

8.3 ETAPIFICACIÓN DEL CCR.

El AJCC ha definido las etapas por medio de la clasificación TNM.

Tabla 6. Clasificación TNM: Tumor Primario (T)

TX: No puede evaluarse el tumor primario
T0: No hay indicación de tumor primario
Tis: Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia*
T1: El tumor invade la submucosa
T2: El tumor invade la muscularis propia
T3: El tumor invade la subserosa o los tejidos pericólicos o perirrectales no peritonealizados a través de la muscularis propia
T4a: El tumor invade o perfora el peritoneo visceral.
T4b: El tumor invade directamente otros órganos o estructuras.

(*) Tis incluye células cancerosas confinadas a la membrana glandular basal (intraepitelial) o a la lamina propia (intramucosa) sin extensión a través de las mucosas musculares a la submucosa. (**) La invasión directa en T4 incluye la invasión de otros segmentos colorrectales por vía serosa; por ejemplo, invasión del colon sigmoideo por un carcinoma del ciego. (***) El tumor adherente macroscópicamente a otros órganos o estructuras, se clasifica como T4. Sin embargo, si no hay tumor presente en la adherencia, microscópicamente, la clasificación deberá ser pT3. Los subestadios V y L deben utilizarse para identificar de la presencia o ausencia de infiltración vascular o linfática.

Fuente: Modificado de Guía Clínica AUGE “Cáncer Colorectal en personas de 15 años y más”. Series Guías Clínicas Minsal, 2013.

Tabla 7. Clasificación TNM: Ganglios linfáticos regionales (N).

NX: No pueden evaluarse los ganglios regionales.
N0: No hay metástasis de los ganglios linfáticos regionales.
N1: Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales.
N1a: Metástasis en 1 ganglio linfático regional.
N1b: Metástasis en 1 a 2 ganglios linfáticos regionales.
N1c: Depósito (s) de tumor en la subserosa, mesenterio, o no peritoneal pericólico o tejidos perirectal sin metástasis regional nodal.
N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.
N2a: Metástasis en 4-6 o más ganglios linfáticos regionales.
N2b: Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales.

Fuente: Modificado de Guía Clínica AUGE “Cáncer Colorectal en personas de 15 años y más”. Series Guías Clínicas Minsal, 2013.

Tabla 8. Clasificación TNM: Metástasis distante (M).

M0: No hay metástasis a distancia.
M1: Metástasis distancia.
M1a: Metástasis confinada a un órgano o sitio (por ejemplo, hígado, pulmón, ovario,

no regional nódulo).

M1b: Metástasis en más de un órgano/sitio o en el peritoneo.

Fuente: Modificado de Guía Clínica AUGE “Cáncer Colorectal en personas de 15 años y más”. Series Guías Clínicas Minsal, 2013.



- Agrupación por estadíos del AJC.

Estadío 0	Tis, N0, M0
Estadío I	T1, N0, M0 o T2, N0, M0
Estadío IIA	T3, N0, M0
Estadío IIB	T4a, N0, M0
Estadío IIC	T4b, N0, M0
Estadío IIIA	T1-T2, N1/N1c, M0 o T1, N2a, M0
Estadío IIIB	T3-T4a, N1/N1c, M0 o T2-T3, N2a, M0 o T1-T2, N2b, M0
Estadío IIIC	T4a, N2a, M0 o T3.T4a, N2b, M0 o T4b, Ni-N2, M0
Estadío IVA	Cualquier T, cualquier N, M1a
Estadío IVB	Cualquier T, cualquier N, M1b

Fuente: Modificado de Guía Clínica AUGÉ “Cáncer Colorectal en personas de 15 años y más”. Series Guías Clínicas Minsal, 2013.

