



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Farmacia -Programa de Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología

**Inhibición del crecimiento en modelos celulares de cáncer  
de próstata mediante la administración de vectores  
adeno-asociados que transducen shARN-*OLR-1***

Tesis para optar al grado de  
Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología

RITA PAULINA CERRO GARRIDO  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2017

Profesor Guía: Jorge Toledo Alonso  
Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## Tabla de contenidos

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XIV</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 CÁNCER DE PRÓSTATA.....	1
1.1.1 <i>Epidemiología</i> .....	1
1.1.2 <i>Factores de riesgo</i> .....	3
1.1.3 <i>Desarrollo y progresión del Cáncer de próstata</i> .....	4
1.1.4 <i>Terapias actuales para el cáncer de próstata</i> .....	7
1.2 TERAPIA GÉNICA.....	9
1.3 VECTORES ADENO-ASOCIADOS .....	13
1.3.1 <i>Estructura de los virus adeno-asociados y los vectores adeno-asociados recombina</i> <i>ntes</i> .....	14
1.3.2 <i>Ciclo de los AAV</i> .....	17
1.3.3 <i>Producción de rAAV</i> .....	18
1.3.4 <i>Purificación de rAAV</i> .....	21
1.3.5 <i>Aplicación de vectores virales adeno-asociados recombina</i> <i>ntes en cáncer</i>	22
1.4 BLANCOS MOLECULARES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA .....	24

1.5	RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD OXIDADA LIGADO A LECTINA.....	26
1.5.1	<i>Conformación de LOX-1 en membrana.....</i>	28
1.5.2	<i>Regulación, expresión y función de LOX-1 .....</i>	29
1.5.3	<i>LOX-1 y su relación con procesos de angiogénesis e invasión tumoral. ...</i>	33
1.5.4	<i>LOX-1/LDLox y su relación con la progresión del cáncer de próstata.....</i>	36
<b>2</b>	<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
6.1	SOLUCIONES.....	44
6.2	SOLUCIONES BUFFERS.....	45
6.3	VECTORES PLASMÍDICOS.....	45
6.4	KITS COMERCIALES .....	46
6.5	PROTOCOLO CULTIVO CELULAR .....	47
6.6	PROTOCOLO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. ....	48
6.7	OBTENCIÓN DE LDL. ....	49
6.7.1	<i>Generación de LDL oxidada. ....</i>	50
6.7.2	<i>Determinación del cambio de movilidad electroforética de la LDLox. ....</i>	51
6.7.3	<i>Determinación de la concentración de malondialdeido MDA en LDLox.....</i>	51
6.7.4	<i>Construcción del plásmido de transferencia adeno-asociado pAAV/IRF682.</i>	

6.8	CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE TRANSFERENCIA ADENO-ASOCIADO PARA EXPRESIÓN DE SHARN CONTRA EL GEN <i>OLR-1</i> .....	54
6.9	CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE SILENCIAMIENTO ADENO-ASOCIADO PAAV/SHARN- <i>OLR-1</i> .....	55
6.10	TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES. ....	56
6.11	PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO A ESCALA MINI PREPARATIVA. ....	56
6.12	ANÁLISIS DE COLONIAS POSITIVAS PARA EL PRODUCTO DE LIGACIÓN.....	57
6.13	PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO A ESCALA MASIVA. ....	58
6.14	DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD Y EFICIENCIA DE SILENCIAMIENTO DE LOS PLASMÍDIOS QUE MEDIAN LA EXPRESIÓN DEL SHARN CONTRA EL GEN <i>OLR-1</i> . ....	59
6.15	GENERACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES ADENO-ASOCIADAS. ....	59
6.15.1	<i>Transfección de HEK-293AAV con poli-etilenimina para producción de partículas virales adeno-asociadas.</i> ....	59
6.15.2	<i>Obtención de partículas virales adeno-asociadas.</i> .....	60
6.15.3	<i>Purificación de vectores virales Adeno-asociados mediante cromatografía en matriz de intercambio iónico.</i> .....	61
6.15.4	<i>Determinación del título viral.</i> .....	62
6.16	GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES DE CÁNCER PRÓSTATA, C4-2B, A TRAVÉS DE TRANSDUCCIÓN CON PARTICULAR VIRALES ADENO-ASOCIADAS. ....	63
6.16.1	<i>Transducción de células C4-2B con vectores adeno-asociados AAV/IRF682 y AAV/IRF682/shARN-OLR-1.</i> .....	63
6.16.2	<i>Selección de células positivamente transformadas mediante Citometría de Flujo con cell Sorting.</i> .....	63



6.16.3	<i>Análisis de expresión del receptor LOX-1 mediante western blot en líneas celulares de cáncer de próstata C4-2B</i> .....	64
6.17	ANÁLISIS DEL EFECTO DE LDLX EN LA EXPRESIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA DE MARCADORES PRO-ANGIOGÉNICOS, MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL Y LOX-1 EN LAS LÍNEAS CÉLULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA: C4-2B, C4-2B/IRF682 Y C4-2B/IRF682/SHARN-OLR-1.....	66
6.17.1	<i>Tratamientos de células de cáncer de próstata con LDLx</i> .....	66
6.17.2	<i>Extracción de proteínas</i> .....	66
6.17.3	<i>SDS-PAGE y Western Blot</i> .....	67
6.18	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN RELATIVA A NIVEL DE MARN DE MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS, TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL Y LOX-1 EN LAS LÍNEAS CÉLULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA: C4-2B, C4-2B/IRF682 Y C4-2B/IRF682/SHARN-OLR-1 TRATADAS CON LDLX.....	68
6.18.1	<i>Extracción de ARN total</i> .....	68
6.18.2	<i>Análisis de expresión relativa de mARN mediante PCR en tiempo Real de 1 paso</i> . 69	
6.19	ENSAYOS DE XENOGRAFT SUBCUTÁNEOS EN RATONES NUDE. ....	69
6.20	ANÁLISIS DE DATOS.....	70
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>73</b>
7.1	CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE TRANSFERENCIA ADENO-ASOCIADO QUE EXPRESA LA PROTEÍNA FLUORESCENTE INFRARROJA, PAAV/IRF682.....	73
7.2	CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO DE TRANSFERENCIA ADENO-ASOCIADO QUE CO-EXPRESA LA PROTEÍNA FLUORESCENTE INFRARROJA Y EL SHARN CONTRA EL GEN <i>OLR-1</i> , PAAV/IRF682/SHARN-OLR-1.....	75

7.3	CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO DE TRANSFERENCIA ADENO-ASOCIADO QUE EXPRESA EL SHARN CONTRA EL GEN <i>OLR-1</i> , PAAV/ <i>SHARN-OLR-1</i> .....	77
7.4	ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS VECTORES PLASMIDIALES PAAV/ <i>IRF682</i> , PAAV/ <i>IRF682/SHARN-OLR-1</i> Y PAAV/ <i>SHARN-OLR-1</i> .....	79
7.5	GENERACIÓN DE VECTORES VIRALES ADENO-ASOCIADOS RECOMBINANTES AAV/ <i>IRF682</i> Y AAV/ <i>IRF682/SHARN-OLR-1</i> . ....	83
7.6	GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES DE CÁNCER DE PRÓSTATA C4-2B QUE EXPRESAN ESTABLEMENTE LA PROTEÍNA TRAZADORA <i>IRF682</i> . ....	85
7.7	GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PRÓSTATA C4-2B ESTABLE QUE CO-EXPRESA LA <i>IRF682</i> CON EL SHARN CONTRA MARN DEL GEN <i>OLR-1</i> . ....	87
7.8	GENERACIÓN DE LDL OXIDADA MEDIANTE LA OXIDACIÓN DE LDL CON IONES $Cu^{2+}$ . ....	92
7.9	LA LDLOX INCREMENTA LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR <i>LOX-1</i> Y EL USO DE SHARN DIRIGIDOS CONTRA EL MARN DE <i>LOX-1</i> PREVIENE ESTE EFECTO. ....	94
7.10	LA LDLOX INDUCE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES PRO-ANGIOGÉNICOS EN LAS CÉLULAS C4-2B Y ESTE EFECTO DEPENDE DEL RECEPTOR <i>LOX-1</i> . ....	96
7.11	LA LDLOX INDUCE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL EN LAS CÉLULAS C4-2B Y ESTE EFECTO DEPENDE DEL RECEPTOR <i>LOX-1</i> . 100	
7.12	<i>LOX-1</i> ES DETERMINANTE PARA EL CRECIMIENTO DE <i>XENOGRAFT</i> SUB-CUTÁNEOS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA C4-2B. ....	104
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>106</b>
8.1	GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR ESTABLE DE CÁNCER DE PRÓSTATA C4-2B, CON EXPRESIÓN REDUCIDA DEL RECEPTOR <i>LOX-1</i> .....	107

8.2	LA LDLOX INCREMENTA LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR LOX-1 Y EL USO DE SHARN DIRIGIDOS CONTRA EL MARN DE LOX-1 PREVIENE ESTE EFECTO. ....	110
8.3	LA LDLOX INDUCE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES PRO-ANGIOGÉNICOS EN LAS CÉLULAS C4-2B Y ESTE EFECTO DEPENDE DEL RECEPTOR LOX-1.....	112
8.4	LA LDLOX INDUCE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL EN LAS CÉLULAS C4-2B Y ESTE EFECTO DEPENDE DEL RECEPTOR LOX-1. 115	
8.5	LOX-1 ES DETERMINANTE PARA EL CRECIMIENTO DE XENOGRAFT SUB-CUTÁNEOS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA C4-2B. ....	118
<b>9</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>121</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>122</b>



## Índice de figuras

<b>Fig. 1.</b>	Tasas de Incidencia y mortalidad de cáncer en Chile estimadas por el proyecto GLOBOCAN 2012.....	<b>2</b>
<b>Fig. 2.</b>	Zonas de la glándula prostática .....	<b>5</b>
<b>Fig. 3.</b>	Estadios clínicos patológicos del Cáncer de próstata .....	<b>7</b>
<b>Fig. 4.</b>	Aplicaciones clínicas de la terapia génica para el tratamiento de diversas enfermedades.....	<b>11</b>
<b>Fig. 5.</b>	Representación esquemática de estructura de los genomas de AAV de tipo silvestre y vectorial .....	<b>16</b>
<b>Fig. 6.</b>	Representación esquemática de la estructura y producción de un vector de adenoasociado recombinante .....	<b>20</b>
<b>Fig. 7.</b>	Modelo esquemático de la estructura de LOX-1 .....	<b>27</b>
<b>Fig. 8.</b>	Representación esquemática de la estructura extra-celular del receptor LOX-1 .....	<b>29</b>
<b>Fig. 9.</b>	Vías de transducción de señales e importancia fisiopatológica de LOX-1 .....	<b>32</b>
<b>Fig. 10.</b>	Generación del plásmido pAAV/IRF682.....	<b>74</b>
<b>Fig. 11.</b>	Generación del plásmido pAAV/IRF682/shARN-OLR-1. ....	<b>76</b>
<b>Fig. 12.</b>	Generación del plásmido pAAV/shARN-OLR-1.....	<b>78</b>
<b>Fig. 13.</b>	Ensayo funcional de la expresión de la proteína fluorescente infrarroja.....	<b>80</b>
<b>Fig. 14.</b>	Análisis de expresión del receptor LOX-1 en células HeLa transfectadas con los plásmidos pAAV/IRF682, pAAV/IRF682/shARN-OLR-1, pAAV/shARN-OLR-1.....	<b>82</b>

<b>Fig. 15.</b>	Obtención y purificación de vectores recombinantes AAV.....	<b>84</b>
<b>Fig. 16.</b>	Transducción de células C4-2B con el vector adeno-asociado IRF682.....	<b>86</b>
<b>Fig. 17.</b>	Transducción de células C4-2B con el vector adeno-asociado IRF682/shARN-OLR-1.....	<b>88</b>
<b>Fig. 18.</b>	Caracterización de las células C4-2B establemente transformadas con AAV/IRF682 y AAV/IRF682/shARN-OLR-1.....	<b>90</b>
<b>Fig. 19.</b>	Determinación de la respuesta lineal entre el número de células y las unidades relativas de fluorescencia en la línea celular estable C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682_shARN.....	<b>91</b>
<b>Fig. 20.</b>	Generación de LDL oxidada mediante la oxidación de LDL con iones $\text{Cu}^{2+}$ .....	<b>93</b>
<b>Fig. 21.</b>	Expresión de LOX-1 en las líneas células estables de cáncer de próstata C4-2B Nativas, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682_shARN expuestas a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox. ....	<b>95</b>
<b>Fig. 22.</b>	La expresión del receptor LOX-1 y su activación con LDLox aumenta la expresión mARN de factores pro-angiogénicos y este efecto depende del receptor LOX-1. ....	<b>98</b>
<b>Fig. 23.</b>	La expresión del receptor LOX-1 y su activación con LDLox aumenta la expresión de factores pro-angiogénicos y este efecto depende del receptor LOX-1. ....	<b>99</b>
<b>Fig. 24.</b>	Expresión relativa de mARN de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células, C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682_shARN, tratadas con y sin LDLox.....	<b>102</b>

- Fig. 25.** Expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células, **103**  
C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN, tratadas con y sin LDLox.
- Fig. 26.** Ensayo de crecimiento tumoral de *xenografts* subcutáneos de células C4- **105**  
2B/IRF682\_shARN y C4-2B/IRF 682 (control) en ratones *nude*. .....



## Índice de tablas

<b>Tabla N°1</b>	Anticuerpos primarios y títulos utilizados para análisis de expresión mediante <i>western blot</i> .	<b>71</b>
<b>Tabla N°2</b>	Anticuerpos secundarios y títulos utilizados para análisis de expresión mediante <i>western blot</i> .	<b>71</b>
<b>Tabla N°3</b>	Secuencia de los partidores utilizados para los análisis de expresión mediante PCR en tiempo real, seguido de esquema de perfil térmico para PCR en tiempo real de un paso.	<b>72</b>



## Abreviaturas

<b>AAV:</b>	Virus adeno-asociado
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AKT:</b>	proteína quinasa B del ingles <i>activated kinase murine thymoma</i>
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm;</b>	ARN mensajero
<b>BSA:</b>	Albúmina de suero de bovino
<b>CMV:</b>	citomegalovirus
<b>CV:</b>	Volumen de columna
<b>EMT:</b>	Transición epitelio mesenquimal
<b>ERK:</b>	Quinasas reguladas por señales extracelulares del ingles <i>Extracellular-Regulated Kinase</i>
<b>FBS:</b>	Suero Bovino fetal
<b>GFP:</b>	Proteína fluorescente verde
<b>h :</b>	Hora
<b>HIF-1:</b>	Factor Inducible por Hipoxia
<b>HRE:</b>	Elemento de Respuesta a Hipoxia
<b>IgG:</b>	Immunoglobulina G
<b><math>\text{I}\kappa\beta</math>:</b>	sub-unidad inhibitoria de NF- $\kappa\beta$
<b>ILs:</b>	Interleuquinas
<b>IRFP</b>	Proteína fluorescente infrarroja
<b>LDL:</b>	Lipoproteína de Baja Densidad
<b>LDLox:</b>	Lipoproteína de Baja Densidad oxidada
<b>LOX-1:</b>	Receptor para Lipoproteínas de Baja Densidad oxidada
<b>LPC:</b>	Lisofosfatidilcolina
<b>MAPK:</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MEC:</b>	Matriz Extracelular
<b>MMPs:</b>	Metaloproteinasas de matriz
<b>MT-MMPs:</b>	Metaloproteinasas de trans-membrana
<b><math>\mu\text{g}</math>:</b>	Microgramo



<b>μL:</b>	Microlitro
<b>μM:</b>	Micromolar
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>min:</b>	minutos
<b>NF-κβ:</b>	Factor Nuclear kappa beta
<b>PEI:</b>	Polietilenimina
<b>PI3K:</b>	Fosfatidil-inositol 3-quinasa
<b>PS:</b>	Fosfatidilserina
<b>pb:</b>	pares de bases
<b>rpm:</b>	revoluciones por minuto
<b>s:</b>	Segundos
<b>shARN;</b>	ARN pequeño de horquilla
<b>siARN;</b>	ARN pequeño de interferencia
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en gel poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>SR:</b>	Receptor <i>scavenger</i>
<b>scr</b>	Proteína quinasa del inglés “ <i>stored response chain</i> ”
<b>TGF-α y β</b>	Factor de Crecimiento Transformante alfa y beta
<b>TK:</b>	Tirosina Quinasa
<b>TNF-α:</b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>VEGF:</b>	Factores de Crecimiento del Endotelio Vascular

## Resumen

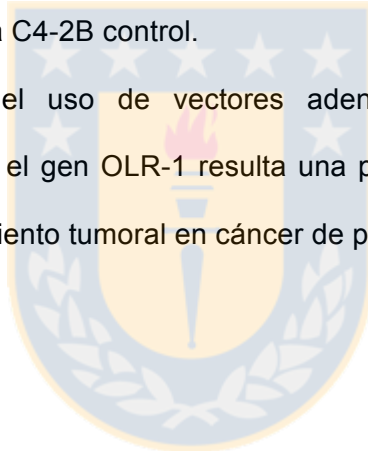
La identificación de nuevos blancos moleculares y la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de cáncer de próstata (CaP) son un desafío en la actualidad. Estudios recientes mostraron la expresión de LOX-1 en células de CaP y en adenocarcinomas prostáticos humanos de estadios clínicos patológicos caracterizados por la invasión local y la generación de metástasis. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que el receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada, LOX-1, participa activamente en la angiogénesis y la transición epitelio-mesenquimal, estos procesos están asociados a la progresión tumoral en modelos celulares de CaP. Como hipótesis de trabajo planteamos que la transducción de shARNs dirigidos contra el receptor LOX-1, mediante el empleo de vectores adeno-asociados, reduce la tasa de crecimiento en modelo celular de cáncer de próstata.

Para aceptar o rechazar esta hipótesis se propuso como objetivo, evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto en la reducción del crecimiento tumoral de células de CaP transducidas con vectores adeno-asociados que median la expresión de ARN de silenciamiento contra el gen codificante para el receptor LOX-1.

Para transformar genéticamente la línea celular de CaP se sub-clonó una secuencia que codifican un *short hairpin* ARN (shARN) contra el gen del receptor LOX-1 (gen OLR-1), en un plásmido recombinante para generación de vectores adeno-asociados, que incluyen la secuencia para expresar una proteína fluorescente infrarroja. En esta tesis se demostró que el uso de vectores adeno-asociados es efectivo para transformar establemente la línea celular de CaP C4-2B. Los resultados

*in vitro* mostraron que el silenciamiento parcial del gen *OLR-1* en células C4-2B, disminuye la expresión de LOX-1 a nivel de ARN mensajero y proteína. Además, se disminuye la expresión de marcadores pro-angiogénicos como VEGF, marcadores asociados a procesos migratorios y de invasión: MMP-2 y MMP-9 y se previene el proceso de transición epitelio mesenquimal. Adicionalmente, en los ensayos *in vivo* utilizando *xenografts* de células C4-2B con expresión y silenciamiento del receptor LOX-1 en un modelo murino inmuno-deficiente, muestran que la línea celular C4-2B/IRF682/shARN\_*OLR-1*, presenta una menor tasa de crecimiento tumoral, en comparación con la línea C4-2B control.

En conclusión, el uso de vectores adeno-asociados recombinantes que expresan shARN contra el gen *OLR-1* resulta una posible estrategia terapéutica para reducir la tasa de crecimiento tumoral en cáncer de próstata.



## Summary

The identification of new molecular targets and the search for new therapeutic strategies for the treatment of prostate cancer (PCa) are ongoing challenges. Recent studies have demonstrated the expression of LOX-1 in prostate cancer cells and in human prostatic adenocarcinomas with clinicopathological stages III and IV, characterized by local invasion and metastasis. Previous results from our group demonstrated that the receptor for oxidized low density lipoprotein LOX-1 is involved in angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition, these processes are directly associated with tumor progression in cellular models of CaP.

We hypothesized that transduction of shARNs directed against the LOX-1 receptor, by the use of adeno-associated vectors, reduces the growth rate in cellular model of prostate cancer. To accept or refute this hypothesis, we propose to evaluate *in vitro* and *in vivo* the effect on the reduction of tumor growth of CaP cell line transduced with adeno-associated vectors, which mediate the expression of silencing RNA against the gene coding to LOX-1 receptor. To transform the CaP cell line, we generated a sequence encoding a short hairpin RNA (shRNA) against the LOX-1 receptor gene (OLR-1 gene), and this sequence was sub-cloned into a recombinant plasmid for the generation of adeno-associated vectors, which include the sequence of an infrared fluorescent protein.

Our results demonstrate that the use of adeno-associated vectors is effective for stably transforming the C4-2B cell line. The *in vitro* results showed that the partial silencing of the OLR-1 gene in C4-2B cells decreases the expression of LOX-1 of both messenger RNA and protein. In addition, the expression of pro-angiogenic markers

such as VEGF, and markers associated with migration and invasion processes such as MMP-2 and MMP-9 are decreased, and the epithelial-mesenchymal transition process is prevented. Additionally, *in vivo* assays using xenografts of C4-2B cells with expression and silencing of the LOX-1 receptor in an immune-deficient murine model, show that the C42B/IRF682/shARN\_OLR-1 cell line has a lower rate of tumor growth, compared to the C4-2B control line.

In conclusion, the use of recombinant adeno-associated vectors expressing shRNA against the OLR-1 gene results in a possible therapeutic strategy for reducing the rate of tumor growth in prostate cancer.



# 1 Introducción

## 1.1 Cáncer de Próstata

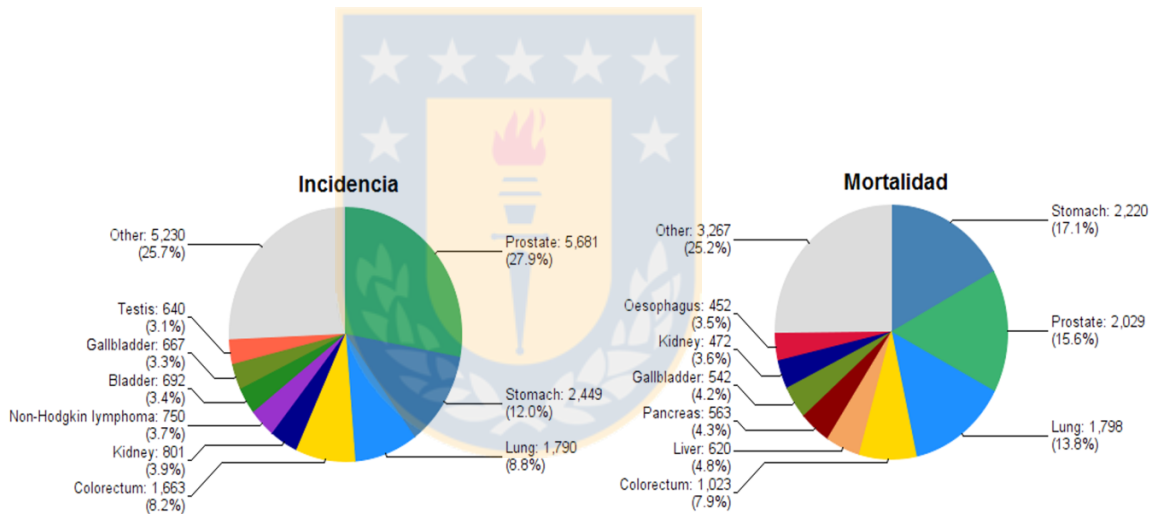
### 1.1.1 Epidemiología

El cáncer constituye un importante problema de salud pública, siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en países en vías de desarrollo [1]. Estudios realizados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y la organización mundial de la salud determinaron que en el mundo se presentaron alrededor de 14 millones de casos de cáncer en el año 2012 y se estima que para el año 2030 el número de pacientes con cáncer por año habrá aumentado a más de 22 millones. Dentro de los tipos de cáncer que se predicen irán en aumento están el cáncer de mama, colon, recto y próstata [2].

El cáncer de próstata (CaP) es uno de los cánceres más comunes en los hombres de la población occidental [3, 4]. Datos obtenidos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) demuestran que a nivel mundial el cáncer de próstata ocupa el segundo lugar en incidencia dentro del total de neoplasias y el quinto lugar en el índice de mortalidad. El año 2012 se presentaron alrededor de 1,1 millones casos que representan una incidencia del 15% y un total 307 mil muertes correspondientes al 6,6 % de índice de mortalidad mundial por cáncer. En Chile, el cáncer de próstata es el cáncer con mayor incidencia (28%) en la población masculina, encontrándose en el año 2012 un total de 5681 casos confirmados y un total 2029 defunciones, ubicándose como la segunda causa de muerte por enfermedad neoplásica en la población masculina chilena [2] (Fig. 1), por ello el cáncer de próstata

es considerada una patología de prioridad en salud pública en nuestro país (Minsal, 2010).

El CaP se presenta frecuentemente en forma latente. Se estima que entre un 15% y un 30 % de los individuos por sobre los 50 años de edad y un 80% de los hombres por mayores de 80 años presentan CaP microscópico no diagnosticado [5]. En pacientes con cáncer de próstata localizado, aproximadamente el 100% de los pacientes presenta una sobrevida de 5 años, sin embargo, en pacientes en los que se han producido metástasis a distancia, la sobrevida de 5 años se reduce al 31% [6].



**Figura 1: Tasas de Incidencia y mortalidad de cáncer en Chile estimadas por el proyecto GLOBOCAN 2012.** El cáncer de próstata se considera como el cáncer con mayor incidencia (27,9%) en la población masculina. En el año 2012 se presentaron 5681 casos confirmados y un total 2029 defunciones a causa del cáncer de próstata, ubicándose como la segunda causa de muerte por enfermedad neoplásica en la población masculina chilena (Figura adaptada de <http://www.iarc.fr/>).

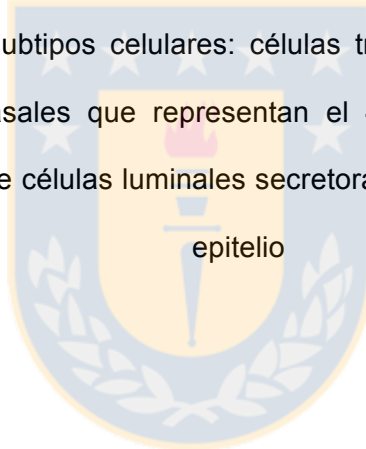
### 1.1.2 Factores de riesgo

Epidemiológicamente se demostraron varios factores de riesgo que predisponen el desarrollo del cáncer de próstata, dentro de los que se incluyen: la edad avanzada, la raza, factores genéticos y hormonales [7, 8]. Además, estudios epidemiológicos de asociación entre la obesidad y el riesgo de cáncer de próstata han proporcionado resultados que indican que no hay asociaciones globales significativas entre el índice de masa corporal (IMC) y el riesgo de cáncer de próstata (IARC, 2002). Se ha sugerido que la estratificación de neoplasias por etapa o grado de malignidad del tumor y la obesidad podrían estar relacionada con un mayor riesgo de desarrollar el cáncer con estadios de alta malignidad o metástasis [9]. Sin embargo, los datos muestran que a mayor tasa de obesidad se incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de próstata con tumores de alto grado de malignidad. Esta teoría se sustenta en un meta-análisis, en donde se muestra que pacientes con alto IMC presentan mayor prevalencia de cáncer de próstata con alto grado de malignidad, en comparación con pacientes con un IMC normal, que presentarían la enfermedad solo de forma localizada [9].



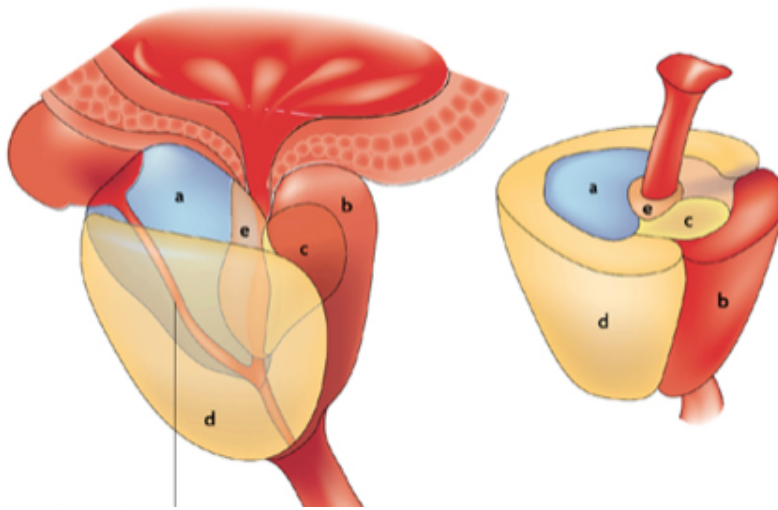
### 1.1.3 Desarrollo y progresión del Cáncer de próstata

La próstata humana es un órgano glandular situado bajo la vejiga y por sobre la uretra, compuesta en un 70% por acinos epiteliales dispuestos en una red de estroma fibromuscular, que corresponde al 30% [10]. McNeal en el año 1981, describió 4 zonas anatómicas en la próstata, cada una en contacto con un área diferente de la uretra, estas zonas son: zona periférica, zona central, región pre-prostática y estroma fibromuscular anterior (Fig. 2). La zona periférica concentra el 75% del tejido glandular de la próstata. Los epitelios están organizados en una capa basal contigua que contiene 3 principales subtipos celulares: células troncales, células de amplificación transitoria, y células basales que representan el 40% de número total de células epiteliales, y una capa de células lumbinales secretoras columnares que forman el resto del



epitelio

[11].



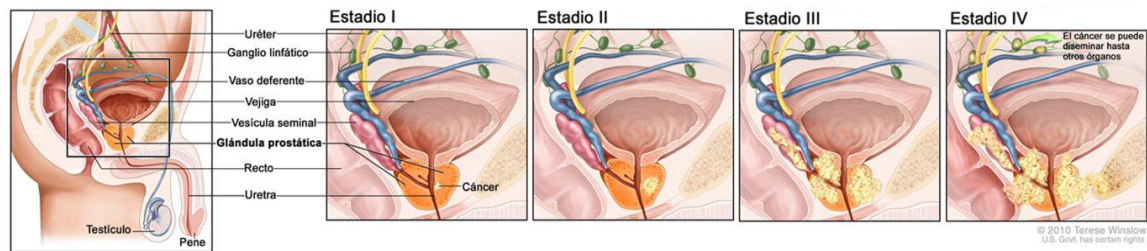
**Figura 2: Zonas de la glándula prostática.** a) zona central, b) zona fibromuscular, c) zona transicional, d) zona periférica y e) región glandular periuretral. (Figura adaptada de De Marzo A., y cols. Nature review, 2007, [12])

La heterogeneidad de la glándula prostática ha dificultado la búsqueda de un origen etiológico del cáncer de próstata [11]. El CaP se clasifica como un adenocarcinoma, y menos recurrentemente se clasifica según la célula de origen. Se ha definido que más de el 95% de los CaP se desarrollan en los ductos del acino prostático, zona periférica de la glándula prostática [13], el 5% restante es de origen histopatológico distinto, dentro de los que se incluye el carcinoma de células pequeñas, el carcinoma de células basales, el carcinoma de células transicionales, el cáncer neuroendocrino, entre otros [14, 15].

En los modelos actuales de carcinogénesis se propone la existencia de un estado pre-maligno, el cual puede promover la tumorigenicidad [16]. En este estado pre-neoplásico se desarrolla una lesión conocida como atrofia inflamatoria proliferativa (PIA) [17], lo que conduce a un estroma activado o reactivo, que se caracteriza por

presentar un mayor porcentaje de miofibroblastos versus células musculares lisas, con un aumento en la generación de colágeno y del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ ), entre otras citoquinas y quimioquinas altamente relacionadas con los procesos de invasión del cáncer de próstata, metástasis y la infiltración de células inmunes en tumor [18-20].

En otros estudios se propone que el PIA es secundado por la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), lesión que estaría implicado en el estadio primario del CaP. Tanto el PIN como los tumores de próstata se localizan en la zona periférica de la glándula, y además estas lesiones pueden encontrarse en las proximidades de los carcinomas invasivos [11, 21]. La aparición de PIN de alto grado, precede al desarrollo del carcinoma en al menos 10 años, ya que éste es el período necesario para que ocurra la progresión tumoral [17]. Finalmente, como en la mayoría de los tumores sólidos, el cáncer de próstata hace metástasis a ganglios, en el estadio clínico patológico III [22], y a órganos distantes como hígado (25% de los casos), pulmones (46% de los casos) y hueso (90% de los casos) [23], en el estadio clínico patológico IV [22] (Fig. 3).



**Figura 3: Estadios clínicos patológicos del Cáncer de próstata.** Estadio I: el CaP comienza con la lesión conocida como neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y se localiza solo en la próstata. Estadio II: el cáncer se presenta como adenocarcinoma latente localizado, cubriendo uno o los dos lóbulos de la próstata. Estadio III: el adenocarcinoma prostático presenta un aumento en la invasión tumoral local, y se disemina más allá de la capa externa de la próstata alcanzando hasta las vesículas seminales. Estadio IV: etapa caracterizada por el desarrollo de metástasis a ganglios linfáticos locales, y órganos distantes como huesos, pulmones e hígado [22].

#### 1.1.4 Terapias actuales para el cáncer de próstata

Las opciones de tratamiento para el cáncer de próstata dependen de la clasificación TNM (Tamaño-Nódulos-Metástasis), la preferencia del paciente y otras consideraciones, como riesgo operatorio y co-morbilidades. Usando las variables de pronóstico de la categoría T, antígeno específico prostático (PSA), y la puntuación de Gleason (GS) [24], se posiciona a los hombres en grupos de bajo, intermedio o alto riesgo [25].

En pacientes con CaP de riesgo bajo o intermedio los tratamientos comúnmente aplicados son: prostatectomía radical, radioterapia externa (RT) o braquiterapia. Los pacientes con riesgo alto son tratados únicamente con cirugía, o cirugía (o RT) en combinación con terapia de privación de andrógenos, esto debido a un incremento del riesgo de metástasis subclínica [26]. Para los pacientes que desarrollan metástasis o recidiva de la enfermedad, el tratamiento paliativo aplicado incluye: privación continua androgénica, quimioterapia con docetaxel y prednisona, manipulación hormonal

secundaria usando abiraterona o enzalutamida, radionucleidos sistémicos e inmunoterapia (Sipulcel-T) [27].

En cada uno de los tratamientos mencionados pueden ocasionar efectos secundarios adversos como: disfunción eréctil (86% de los pacientes con tratamiento de privación androgénica, y 58% con prostatectomía radical), problemas en las vías urinarias (35% de los pacientes con cirugía de próstata, 5-20% en radioterapia) e intestinales (29% de los tratamientos con radiación de haz externo), en el caso de la terapia hormonal adicionalmente puede provocar: un aumento en la sensación de calor (o sofocos), hinchazón de los pechos (ginecomastia), pérdida del impulso sexual, cansancio, depresión, pérdida de memoria y osteoporosis [28-31]. Por su parte la privación de andrógenos realizada mediante orquiectomía bilateral, en donde se erradica la principal fuente de las hormonas sexuales en el hombre, y/o castración química (uso de drogas entre las que se incluyen los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), los antagonistas de GnRH, así como drogas anti-androgénicas), resulta en una terapia inicialmente exitosa, pero en más del 80% de los casos la neoplasia reaparece desarrollando cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) [32]. La reaparición del cáncer con este fenotipo tumoral presenta mayor agresividad y capacidad de invasión, no respondiendo a las terapias tradicionales, lo cual resulta en un pronóstico negativo para estos pacientes [33]. La deficiencia de testosterona es asociada a un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y metabólicas; sin embargo, la relación no está clara y evidencia reciente sugiere que este tratamiento puede aumentar el riesgo de eventos cardiovasculares en hombres con co-morbilidades significativas [34, 35].

Las estrategias combinadas aumentan la tasa de supervivencia libre de progresión, sin embargo todas las terapias mencionadas presentan una serie de efectos secundarios adversos que menoscaban la integridad física y psicológica de estos pacientes. Por esta razón es importante diseñar nuevas estrategias para tratamiento del cáncer de próstata que sean tejido-específica, de alta eficiencia y mínima toxicidad. Una alternativa es la implementación de terapia génica.

## **1.2 Terapia Génica**

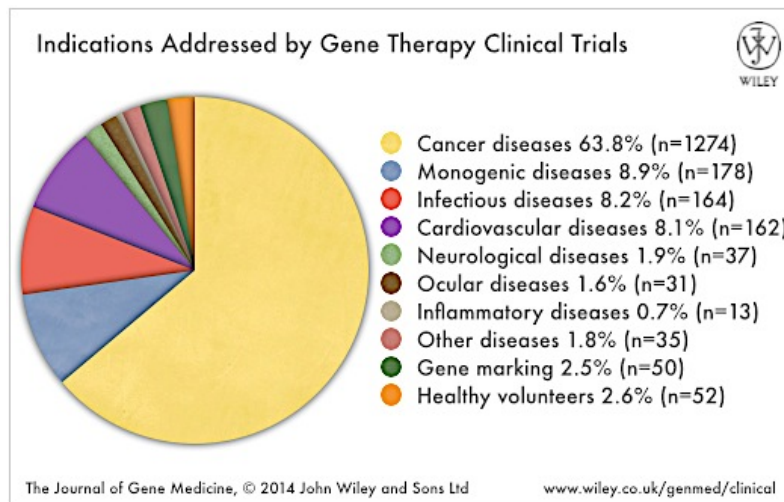
Los avances en el conocimiento acerca de la biología molecular del cáncer ha permitido el diseño de nuevos métodos de modulación terapéutica específica. Sin embargo, otro aspecto crucial en la generación de un tratamiento anti-tumoral es la elección de una estrategia de entrega tejido-específica que maximice la eficiencia y minimice la toxicidad del sistema terapéutico aplicado. Por ello se consideró el uso de la terapia génica como herramienta para el diseño de nuevas alternativas farmacológicas.

La terapia génica consiste en la inserción de ácidos nucleicos *in vivo* o *ex vivo* en el interior de células diana con el objetivo de generar un cambio funcional que se traduzca en un efecto terapéutico [36, 37]. Esta modalidad terapéutica fue descrita hace 50 años por los Doctores W. Szybalski y E. Szybalska cuyos experimentos evidenciaron por primera vez la transferencia de genes a células de mamíferos [38]. El primer protocolo clínico aprobado por la FDA para el uso de la terapia génica fue aplicado en 1990, por W. French Anderson, quien propone el uso de células de médula ósea tratadas con un vector retroviral que porta una copia correcta del gen que codifica

para la enzima adenosina desaminasa, la cual se encuentra mutada en una enfermedad que forma parte del grupo de las inmunodeficiencias severas combinadas (SCID) [36].

El desarrollo de esta área de la biomedicina ha permitido, la puesta en marcha de numerosos protocolos clínicos de terapia génica para el tratamiento experimental de enfermedades de diverso origen: tumoral, genético, infeccioso, cardiovascular, degenerativo, entre otros. Sin embargo, esta alternativa terapéutica mantiene el foco principalmente en el cáncer (Fig.4) [39].





**Figura 4: Aplicaciones clínicas de la terapia génica para el tratamiento de diversas enfermedades [39].**

La transferencia de material genético exógeno puede realizarse empleando diferentes métodos, incluyendo en la mayoría de los casos la utilización de un vehículo o vector que facilite la introducción de los ácidos nucleicos [36, 40]. En este contexto, se han definido algunos requisitos y parámetros para evaluar comparativamente los sistemas de transferencias y definir al sistema de transferencia ideal, dentro de estas propiedades se encuentran que el sistema tenga alta capacidad para transportar material genético de gran tamaño y protegerlo de su degradación antes de alcanzar el tejido o célula diana específica; que presente alta eficiencia de internalización de la secuencia de interés y que este permanezca en la célula blanco por el período de tiempo requerido para lograr efectos terapéuticos, que el agente tenga baja o nula toxicidad e inmunogenicidad para el huésped y el entorno, y que su producción sea de bajo costo [41].



Entre los vehículos de transferencia génica, los vectores virales son usados en más del 70% de los ensayos clínicos [42], ya que cumplen en buena medida con los requisitos de un vector ideal [41]. La construcción de un vector eficaz para transducir genes terapéuticos a las células diana es esencial para que la terapia génica resulte exitosa. Los vectores usados para transferir el material genético se pueden dividir en dos categorías: (i) **vectores no virales** y (ii) **vectores virales**. Los vectores no virales, incluyen: plásmidos, nanopartículas, liposomas y polímeros, estos han resultado seguros, de bajo costo y además ofrecen la posibilidad de inserción de genes de tamaño ilimitado [43]. Sin embargo, la metodología de inserción génica mediante transfección y la expresión génica han resultado ineficientes y transitorias en los ensayos *in vivo*, a pesar de que presentan una baja inmunogenicidad [44].

Los vectores virales, tales como vectores adenovirales, vectores retrovirales y lentivirales, proporcionan la transducción génica y expresión eficaz; sin embargo, presentan desventajas, dentro de las que se incluyen: limitación en el tamaño del transgén a transferir, posible tumorigenicidad, mutagénesis por inserción inespecífica y alto rechazo inmunológico por parte del huésped en su aplicación *in vivo*. Estos inconvenientes han limitado el éxito de los vectores virales en ensayos clínicos. Por lo tanto, es necesario que los vectores a utilizar en terapia génica tengan (i) alta capacidad de transferencia, (ii) bajo rechazo inmunológico, y (iii) propicien la expresión génica a largo plazo. En la actualidad se demostró que los vectores virales adeno-asociados (AAV) recombinantes cumplen con los requisitos anteriormente expuestos [45-48].

### 1.3 Vectores Adeno-Asociados

En la última década la terapia génica ha centrado su estudio en el desarrollo y aplicación de los virus adeno-asociados (AAV). Los AAV fueron descubiertos por microscopía electrónica como contaminantes en preparaciones de adenovirus en 1965 [49].

Los virus adeno-asociados pertenecen a la familia *parvoviridae*, específicamente el género dependovirus [49]. Los miembros de este género requieren un virus auxiliar, tal como adenovirus o virus del herpes simple, para permitir su replicación en el huésped. En ausencia de un virus ayudante, los AAVs establecen un ciclo lisogénico dentro de la célula huésped [49]. Los AAVs pueden integrar su genoma al de la célula huésped de manera estable y sin inducir una respuesta inmune humoral y celular. Además, infectan diversos tipos celulares tales como células del sistema nervioso, hígado, músculo esquelético, riñón, ojo y pulmón [50]. De los 12 serotipos de AAV descubiertos hasta el momento, el serotipo 2 (AAV2) es el mejor caracterizado y el más utilizado como vector recombinante. Alrededor del 90% de los humanos es seropositivo para los AAV, pero no han sido asociados a ninguna patología conocida [51].

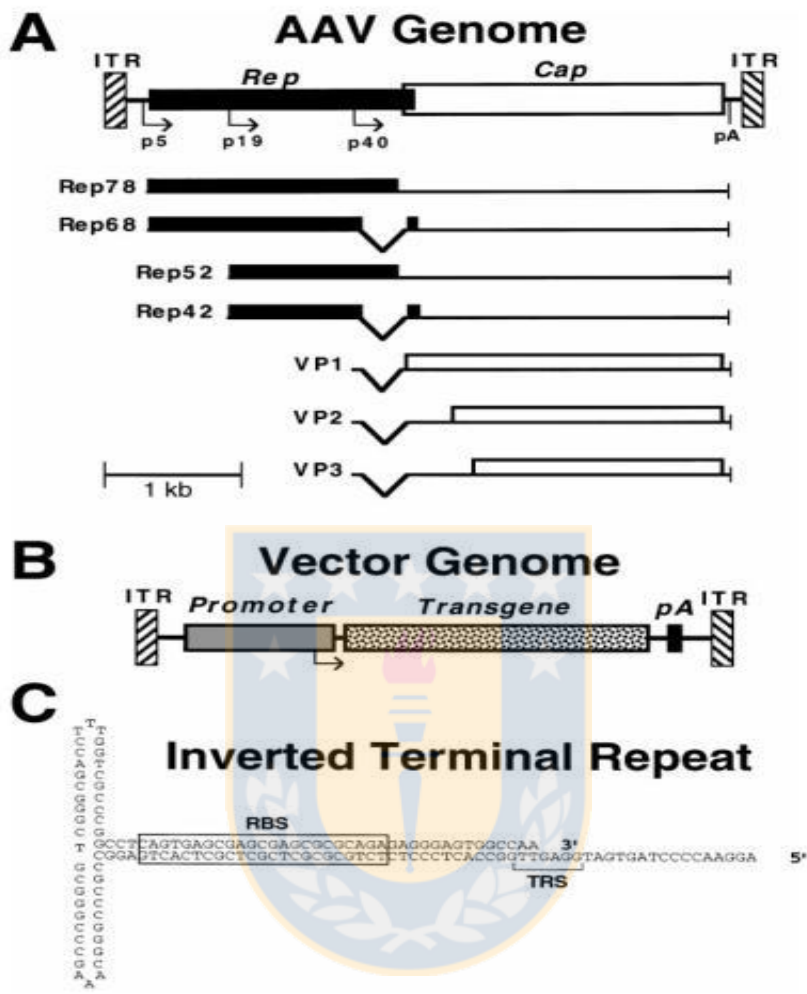
### **1.3.1 Estructura de los virus adeno-asociados y los vectores adeno-asociados recombinantes**

Los virus adeno-asociados no contienen proteínas de envoltura y su ADN está rodeado por proteínas de la cápside, las cuales conforman una estructura icosaédrica de 18-25 nm de diámetro [52]. Son virus de ADN de monocatenario de 4,7 Kb y su genoma contiene los genes rep (replicación) y cap (cápside) (Fig. 5). El gen rep codifica para cuatro proteínas, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 que tienen actividad helicasa y ATPasa. Las proteínas Rep78 y Rep68, participan en la replicación, integración y en la formación de genomas virales de cadena sencilla [53, 54]. Las proteínas Rep52 y Rep40 están involucradas en el agrupamiento del genoma viral para el empaque dentro de las partículas. El gen cap codifica para tres proteínas estructurales VP1 (87 kDa), VP2 (73 kDa) y VP3 (62 kDa). La proteína VP1 corresponde a la proteína involucrada en la infectividad del virus. VP2 parece estar involucrada en el ensamblaje de la cápside y VP3 en el tropismo viral [55]. Estas tres proteínas son fundamentales para la generación de las partículas infecciosas y, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de estas distinguen los 12 serotipos conocidos hasta ahora [54, 56].

El genoma de los AAV está flanqueado por dos secuencias repetidas terminales invertidas (ITRs, del inglés Inverted Terminal Repeats) de 145 nucleótidos que forman una estructura característica de horquilla en forma de T debido a su naturaleza palindrómica (Fig. 5). El ITR posee el sitio de unión de Rep (RBS) y el sitio de resolución terminal (TRS), que son críticos para el proceso de replicación (Fig. 5), además son los únicos elementos cis que se requieren para la replicación y empaquetamiento viral. Los virus adeno-asociados recombinantes (rAAV) o vectores

virales adeno-asociados, conservan sólo las secuencias ITRs que flanqueaban los genes rep y cap, los cuales son sustituidos por las secuencias regulatorias y el transgén de interés (Fig. 5). En la actualidad algunos rAAV están formados por los ITRs junto con las proteínas Rep de un serotipo viral y las proteínas de la cápside de otro serotipo (AAV2/1) generando pseudotipos de AAV [57].





**Figura 5: Representación esquemática de estructura de los genomas de AAV de tipo silvestre y vectorial.** (A) Mapa del genoma de AAV de tipo silvestre, incluyendo Rep y Cap, promotores (p5, p19, p40 y), sitio de poliadenilación (pA) y repeticiones terminales invertidas (ITR). La transcripción viral codifica las diferentes proteínas rep (Rep42, Rep52, Rep68, Rep78) y cap (VP1, VP2, VP3) que se muestran debajo de la del genoma. (B) Mapa de un vector AAV, mostrando la sustitución de los genes virales Rep y Cap por una unidad transcripcional (promotor, ADNc transgen, y el sitio de poliadenilación). (C) Horquilla en forma de T de la ITR del AAV, con las ubicaciones del sitio de unión de Rep (RBS) y el sitio de resolución terminal (TRS). Modificado de [58].

### 1.3.2 Ciclo de los AAV

La infección de los AAV inicia con el anclaje de la cápside viral a la superficie celular a través de un receptor y co-receptores. Se describió que el heparán sulfato es el receptor para el AAV2; funcionando como co-receptores las integrinas  $\alpha V\beta 5$  (incluyendo las integrinas V1 a la V5), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, el receptor del factor crecimiento de fibroblastos-1 y el receptor de laminina [59, 60]. La interacción entre los AAV y las integrinas resulta en la endocitosis de las partículas virales mediante vesículas de dependientes de clatrina dentro de la célula. La acidificación cercana al núcleo del endosoma tardío permite el escape del virus para generar una infección exitosa [61] [62].

En presencia del virus colaborador, adenovirus o virus herpes simple, se posibilita la replicación del virus, la expresión de los genes virales y la posterior generación de viriones dando lugar al ciclo lítico del AAV [52, 57]. En ausencia del virus auxiliar, la replicación se ve limitada y se da paso al ciclo lisogénico o de latencia, que consiste en la integración de la información del virus en el genoma celular del huésped [63].

Los AAV silvestres, para establecer su latencia, integran su ADN de 4 kb en una región específica del cromosoma 19 (q13.4) que se denominada AAVS1 [63, 64]. Una vez producida la co-transducción en la célula, por parte del virus colaborador (Adenovirus o herpes virus), se activa el ciclo lítico del AAV, en el cual se replica el genoma viral. En el caso de los rAAV, las regiones ITRs son los únicos elementos virales que son conservados, por la remoción de los genes rep y cap [65] (Fig. 5). Esto produce la pérdida de la capacidad de integración aleatoria al genoma celular evitando la posibilidad de generar efectos neoplásicos, una gran ventaja para su uso como

vector de transferencia génica recombinante. Cuando los rAAV transducen las células se promueve la formación de un concatámero del genoma del vector que corresponde a una estructura cabeza-cola por la hibridación de las regiones ITRs [66].

El concatámero es una estructura con elevada estabilidad episomal y se mantiene viable para su expresión. Estas estructuras son las responsables de un alto porcentaje de transducción del transgén y su expresión prolongada en el tiempo [67]. Se demostró que la expresión génica por uso de vectores AAV puede perdurar hasta 3 años después de la transducción, además inducen una respuesta inmune humoral y celular limitada [45, 68-70].

### **1.3.3 Producción de rAAV**

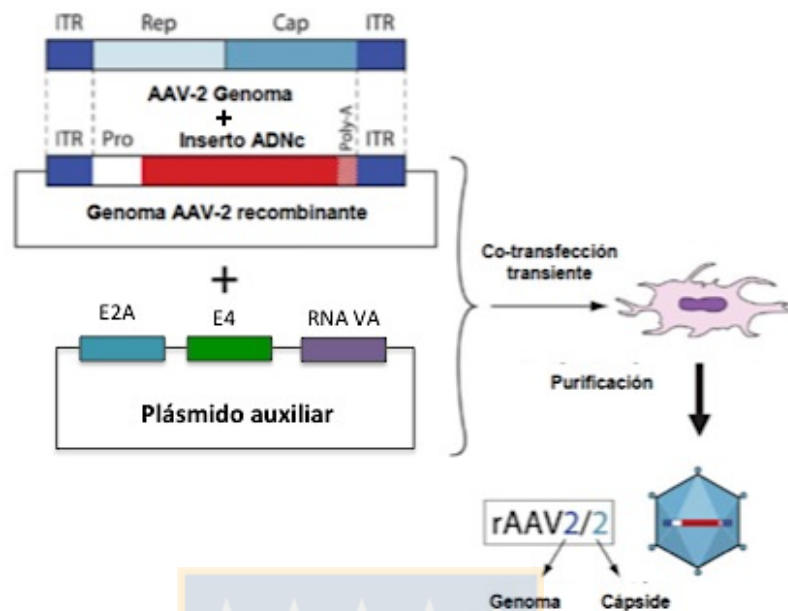
Los principales sistemas para la producción de rAAV son por transfección transitoria de plásmidos en líneas celulares y por medio de baculovirus con células de insecto [71]. Para la producción de un vector viral se requiere del genoma del rAAV en una unidad transcripcional, flanqueada por las regiones ITRs en los extremos, que contenga el transgén de interés y los elementos reguladores como promotor y la cola de poli A, los genes rep y cap del AAV silvestre y los genes del virus colaborador necesarios para formar el virión [72].

La producción por transfección transitoria se realiza en células Hela (células de cáncer cérvico uterino, acrónimo de Henrietta Lacks) y HEK-293 (riñón embrionario humano, del inglés human embryonic kidney) las cuales expresan establemente los genes E1A y E1B del adenovirus [73]. Las células son co-transfectadas con plásmidos que contienen los genes necesarios *in trans* para la producción rAAV, esto como medida de seguridad para evitar la formación de vectores virales competentes para la

replicación (Fig. 6). Un plásmido contiene la unidad transcripcional con el gen de interés, regulado por un promotor y flanqueado por los ITRs. Los genes rep y cap, que se encuentran en la forma silvestre del virus, y los genes de los adenovirus necesarios para la replicación del AAV, E2A, E4 y el ARN VA están clonados en uno o dos plásmidos separados, mientras que los genes E1A y E1B ya están contenidos en la línea celular [56].

Las primeras producciones de rAAV requerían de la co-infección con adenovirus silvestres, por lo que estas producciones tenían como principal desventaja la presencia de adenovirus como contaminante, poniendo en riesgo la seguridad de su uso en clínica. El desarrollo del sistema mediante co-transfección de 2 plásmidos aumentó la eficiencia de producción de rAAV en títulos diez veces mayores que con el sistema basado en 3 plásmidos, del orden de  $10^2$  gv/célula (genomas virales por célula) [74]. La ventaja del sistema de producción mediante transfección es que se obtienen en su mayoría partículas virales completas.





**Figura 6: Representación esquemática de la estructura y producción de un vector de adenoasociado recombinante.** Un vector de AAV recombinante se produce mediante la supresión de los genes rep y cap a partir del genoma de AAV de tipo salvaje que deja aproximadamente 4,7 kb para insertar un promotor (Pro) y el ADNc de un gen terapéutico tapado con un sitio de poli-adenilación (poliA) entre los las dos repeticiones terminales invertidas (ITR). Esta construcción genoma luego se inserta en un plásmido y se utiliza con un plásmido auxiliar que contiene los genes rep y cap para transfectar células en cultivo. Estas células producen un AAV recombinante incompetente para la replicación. En esta figura tanto el genoma y la cápside se originan a partir de un serotipo de AAV2 generando así un vector rAAV2 / 2 [75].

#### 1.3.4 Purificación de rAAV

El primer método de purificación descrito para los rAAV fue la purificación por gradiente de CsCl. Soluciones de CsCl de diferente concentración se someten a ultracentrifugación, formando un gradiente de densidad [76]. Esta técnica permite purificar a baja escala todos los serotipos de AAV y separar las partículas virales completas, de las vacías. Algunas desventajas de su utilización son que retiene residuos de CsCl, tóxicos para las células y se presentan agregados de AAV-proteínas que disminuyen la infectividad [76].

Posteriormente, se describió la purificación por centrifugación en gradiente de iodixanol como equivalente a la con CsCl [77]. Esta es una técnica sencilla de realizar y permite separar partículas virales vacías de la completas, siendo no tóxico para la célula. También se ha combinado esta metodología con cromatografía por columnas de heparina o cromatografía de intercambio iónico permitiendo recuperar cinco veces más cantidad de partículas virales y obtener una mayor pureza [78].

Por otra parte, el HPLC es una de las técnicas más utilizadas para la purificación de los rAAV. Con esta técnica se obtienen preparaciones de alta pureza y con más partículas infecciosas. A pesar de que el proceso se realiza en poco tiempo, se necesita equipo y personal altamente especializado, lo que hace que los costos sean elevados [78]. Las cromatografías de intercambio iónico y de afinidad para la purificación de rAAV son métodos rápidos, reproducibles, eficientes, obteniéndose preparaciones con gran pureza. En el caso de la cromatografía de afinidad altamente selectiva permite separar las partículas virales de ADN contaminante. Sin embargo, a pesar de que cerca del 90% de las partículas obtenidas tras la purificación son completas, no pueden discriminar las partículas virales vacías [79]. Recientemente, se

han creado kits comerciales muy útiles para la purificación a pequeña escala de los serotipos AAV2 y AAV5. Los kits han disminuido considerablemente el tiempo empleado en la purificación y se logra obtener títulos aproximados de  $2 \times 10^{11}$  pv/mL [80].

### **1.3.5 Aplicación de vectores virales adeno-asociados recombinantes en cáncer**

La generación de vectores AAVs recombinantes ha propiciado la aplicación de estos vectores en la terapia génica para el tratamiento del cáncer. Esto porque los AAVs tienen baja toxicidad, permiten la expresión del transgén a largo plazo generando baja o nula respuesta inmune en el huésped [46].

Diversos estudios demuestran la aplicación exitosa de los vectores AAVs en la transferencia de diferentes genes en células cancerosas, incluyendo: (i) genes suicidas como el gen de la timidina quinasa para quimioterapia molecular para el cáncer de conducto biliar [81]; (ii) genes relacionados con la inmunidad en los que se incluyen citoquinas, marcadores de superficie celular y antígenos tumorales, Mahadevan y col. el año 2007 propusieron un protocolo para estimular respuesta antígeno específica en cáncer de próstata, mediada por linfocitos T citotóxicos contra el antígeno prostático específico (PSA), previamente presentado por células dendríticas modificadas por medio de la transducción del auto-antígeno de PSA entregado por vectores AAV [82]; (iii) genes anti-angiogénicos para inhibir la iniciación del tumor, el crecimiento y la metástasis, por ejemplo estudios realizados en un modelo murino con cáncer de ovario se observaron efectos anti-tumorales mediados por AAVs, donde la administración de una única dosis de AAV que codificaba para bevacizumab proporcionó la expresión local alta y sostenida de *bevacizumab* en la cavidad peritoneal, suprimiendo

significativamente la carcinomatosis peritoneal y aumentando la sobrevivencia de los animales [83].

Dentro de las estrategias de terapia génica con vectores virales, no solo se incluyen la transducción de genes, sino que también se pueden incorporar herramientas moleculares como los ARNs de interferencias. En los últimos años el uso de ARNi ha surgido como una herramienta para el estudio de la función génica en células de mamíferos [84]. El uso de ARNs de interferencia es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional, el cual puede ser activado por la incorporación de una molécula de ARN de interferencia pequeño de doble hebra el cual corresponda con una secuencia endógena del gen de interés, lo cual resulta en la degradación del mRNA del gen de interés [85]. El silenciamiento génico con ARNi es un proceso biológico, evolutivamente conservado, guiado por ARNs de doble cadena (dsARN, “*double stranded ARN*”) que reconocen transcritos diana por complementariedad de secuencia. Este proceso conduce al silenciamiento génico, degradando los ARN mensajeros o impidiendo la traducción de los mismos [86]. Los ARNs de interferencia incluyen microARNs (miARNs), ARNs de silenciamiento (siARNs) y ARNs con estructura de tallo-anillo o *short hairpin* (shARN) [87].

Los siARNs fueron la primera tecnología de ARNi incorporadas para el silenciamiento de genes en cultivos de células de mamíferos [88]. A pesar de su alta efectividad para disminuir la expresión de genes, presentan una limitación importante al momento de desarrollar estudios *in vivo*, ya que su expresión es limitada en tiempo.

Para mantener el silenciamiento estable de un gen en las células de un organismo, la estrategia apropiada es la transducción de las células con shARN [89]. Estas secuencias al incorporarse al genoma de la célula huésped permiten reducir la

expresión del gen de interés a largo plazo [90], lo que se ha demostrado tanto en estudios *in vitro*, como en aplicaciones *in vivo* [91, 92].

Algunos tipos de ARNs no codificantes como los ARN cortos con estructura de tallo y anillo (shARN) son utilizados en estudios preclínicos para silenciar la expresión de un gen de interés. Sun y col. enfocaron su estudio contra el receptor de andrógenos (AR), el que se encuentra asociado a la progresión del cáncer de próstata. En el ensayo se demostró que la transducción de AAV/shARN, dirigidos contra el receptor de andrógenos, en xenoinjertos de cáncer de próstata en modelo murino atímicos inhibe el crecimiento tumoral e incluso erradica los tumores luego de 10 días [93].

#### **1.4 Blancos moleculares para el tratamiento del cáncer de próstata**

Una vez escogido el vehículo para transferir el material genético en la terapia génica, para propiciar el éxito de su aplicación en el tratamiento del cáncer de próstata, es importante la identificación de moléculas blanco que sean relevantes en los procesos de progresión tumoral (sobrevida, angiogénesis, invasión y/o metástasis). Epidemiológicamente se demostraron varios factores de riesgo que predisponen el desarrollo del cáncer de próstata, dentro de los que se incluyen: la edad avanzada, la raza, factores genéticos y hormonales [7, 8]. Estudios epidemiológicos de asociación entre la obesidad y el riesgo de cáncer de próstata han proporcionado resultados que indican que no hay asociaciones globales significativas entre el índice de masa corporal (IMC) y el riesgo de cáncer de próstata (IARC, 2002). Se ha sugerido que la estratificación de neoplasias por etapa o grado de malignidad del tumor y la obesidad podrían estar relacionada con un mayor riesgo de desarrollar el cáncer con estadios de

alta malignidad, o metástasis [9]. A mayor tasa de obesidad, mayor es el riesgo de desarrollar cáncer de próstata con tumores de alto grado de malignidad. Esta teoría es apoyada por un meta-análisis, en donde se muestra que pacientes con alto IMC, presentan mayor prevalencia de cáncer de próstata con alto grado de malignidad, en comparación a pacientes con IMC normal, que presentarían la enfermedad solo de forma localizada [9]. Por su parte estudios de correlación demostraron además, una asociación entre el aumento en los niveles lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox) en pacientes obesos y un incremento en el riesgo de desarrollar metástasis en cáncer de próstata [94].

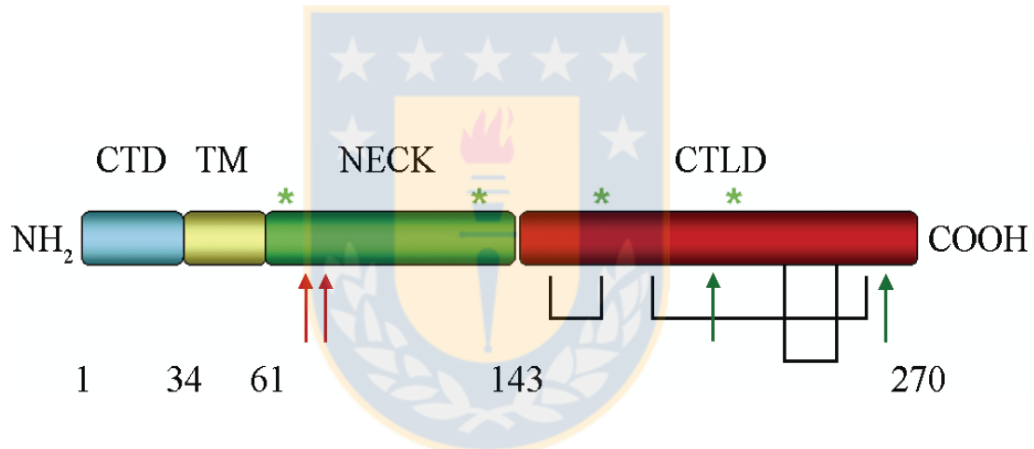
La recurrencia de cáncer de próstata en la forma resistente a la castración se debe a una serie de cambios moleculares interrelacionados y complejos, muchos de los cuales aún no están completamente descritos. En las últimas décadas, los investigadores quieren dilucidar de los mecanismos que estarían implicados en la reincidencia del cáncer de próstata en pacientes tratados con privación de andrógenos. Estudios revelan que a pesar de existir bajos niveles de andrógenos en circulación en pacientes con cáncer próstata tratados con privación de andrógenos el receptor de andrógeno y niveles de andrógenos intra-tumorales permanecen elevados permitiendo la progresión tumoral del cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) [95]. Uno de los mecanismos propuestos para explicar este fenómeno es que las células tumorales son capaces de sintetizar andrógenos de *novo* a partir del colesterol incorporado directamente [96]. Muchos de los cáncer de próstata refractarios a la privación de andrógenos sobre expresan el receptor para LDL y aumentan la captación de colesterol al interior de tumor para la generación de andrógenos, induciendo la activación del receptor de andrógenos, que promueve la activación transcripcional de

genes blancos involucrados en la proliferación, crecimiento y supervivencia de las células tumorales [97]. Sin embargo, cuando se utilizaron ratones *knock-out* para el receptor de LDL no se mostraron cambios en la producción de esteroides sugiriendo que existen otros receptores involucrados en la captación de colesterol y la síntesis de esteroides [98]. En las condiciones oxidantes del micro ambiente tumoral se hace poco probable que la endocitosis de LDL ocurra mediada por receptores para LDL nativa, ya que la oxidación de la LDL en estas condiciones es inminente y por tanto su endocitosis debería estar mediada por receptores *scavenger* para LDLox presente en las células tumorales [99].

### **1.5 Receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada ligado a lectina.**

El reconocimiento, internalización y degradación de lipoproteínas de baja densidad oxidadas en células endoteliales es llevado a cabo por vías independiente de receptores scavengers de macrófagos. En 1997, Sawamura y col. clonan a partir de células endoteliales de aorta de bovino un nuevo receptor para LDLox, el receptor de lipoproteínas de baja densidad ligado a lectina (LOX-1), siendo descrito como uno de los mayores receptores de LDLox en células endoteliales de grandes arterias [100]. El receptor LOX-1 humano es una proteína de membrana tipo II de 40 kDa, codificado por el gen *olr-1*, localizado en cromosoma 12 en la región p12.3-p13.2 [101]. Este receptor posee 4 dominios estructurales; un dominio citoplasmático corto, un dominio transmembrana, un dominio de unión o cuello y un dominio C-terminal tipo lectina-C [102]. Además, posee tres sitios potenciales de N-glicosilación, tres enlaces disulfuro intracatenarios y dos sitios potenciales de clivaje en el dominio de cuello (Fig. 7). El dominio tipo lectina es el sitio de reconocimiento al ligando y es esencial para la unión de este [103]. Estudios de mutagénesis sitio-dirigida demostraron que las secuencias y

residuos en el dominio lectina son esenciales para la localización en la superficie celular de LOX-1 y la unión de ligando [104]. Además se determinó que seis cisteínas pertenecientes a los enlaces disulfuro intercatenarios y la secuencia C-terminal KANLRAQ se requieren para el plegamiento, procesamiento y transporte apropiado de LOX-1 [103]. La delección de los últimos 10 aminoácidos del extremo C-terminal (261-270) o sustituciones de Lys-262 y/o Lys-263 con Ala disminuye la actividad de unión, la cual depende de la interacción de sus residuos de carga positiva otorgada por los residuos básicos mencionados con los de carga negativa del ligando [103].

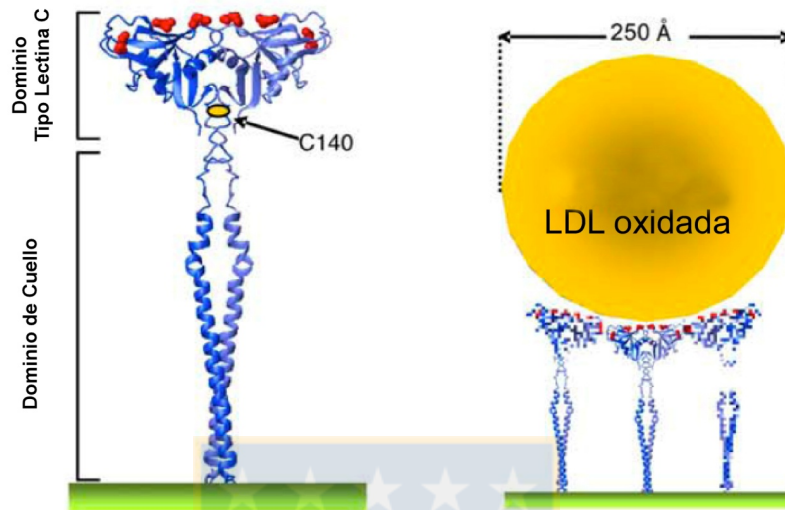


**Figura 7: Modelo esquemático de la estructura de LOX-1.** Los potenciales sitios de N-glicosilación se indican con asteriscos. Las posiciones de los tres enlaces disulfuros se muestran con uniones simples. Las flechas rojas indican los dos sitios potenciales de clivaje. Las flechas verdes indican los sitios de unión de LDLox a los residuos de aminoácidos básicos. Los números indican la posición de los aminoácidos dentro de los dominios CTD: dominio citoplasmático; TM: dominio transmembrana; NECK: dominio de cuello; CTLD: dominio tipo lectina C [105].



### 1.5.1 Conformación de LOX-1 en membrana

Diversos estudios demostraron que las seis cisteínas de la región tipo lectina del extremo C-terminal, participan en la formación de enlaces disulfuro intracatenario de LOX-1 humano [106]. En células COS-7 se identificaron oligómeros de LOX-1 cuya conformación mínima en membrana sería un dímero [107]. LOX-1 existe como un homodímero a través de un enlace disulfuro en C140, y se piensa que el dímero es la unidad mínima en la superficie celular. Sin embargo, estudios de mutagénesis han señalado que la mutante LOX-1 C140S, la cisteína que participa en el enlace intercatenario, todavía tiene la capacidad de formar oligómeros y unir LDLox [108]. Existe evidencia que la conformación de oligómeros de LOX-1 sería independiente del tipo celular, esto demostrado en líneas celulares CHO y HEK-293 [109]. Usando análisis cuantitativo de fluorescencia, se encontró que existe un nivel de expresión umbral de LOX-1 para la unión de LDLox y se logró relacionar el nivel umbral de LOX-1 con la formación de oligómeros. Los resultados indican que la posibilidad de formar estructuras oligoméricas depende de la densidad del receptor. De acuerdo a estudios de movilidad electroforética, el oligómero principal sería un hexámero, esto coincide con el modelo en que la forma activa de LOX-1 se compone de tres homodímeros. Así, comparando el tamaño del dímero con el diámetro de LDLox, sería necesario tres homodímeros para la unión de LDLox [110] (Fig. 8).



**Figura 8: Representación esquemática de la estructura extra-celular del receptor LOX-1.** El receptor LOX-1 presenta una conformación homodimérica con la formación de un enlace intercatenario de las cisteínas 140. Formación de estructuras tipo hexámeros en la superficie de la membrana celular es la organización necesaria para poder unir una molécula de LDLox, basada en la estructura cristalina del dominio C-terminal tipo lectina y el tamaño de LDLox [99, 110].

### 1.5.2 Regulación, expresión y función de LOX-1

Como se mencionó, una propiedad de los receptores scavenger es la capacidad de unir una variedad de ligandos que no tienen una relación estructural. Se identificaron múltiples ligandos para LOX-1: (1) lipoproteínas modificadas [111], (2) químicos polianiónicos, (3) ligandos celulares (4) fosfolípidos aniónicos [112]. Estudios en células CHO que expresan establemente el receptor, demostraron que la internalización de LDL sólo se produce en su forma oxidada (LDLox) y no con la forma acetilada (LDLac), reconociendo específicamente a su ligando y no a ligandos para receptores scavenger tipo A ó tipo B [113]. En cultivos de células endoteliales de aorta

de bovino (BAEC) y (CHO) que sobre expresan LOX-1 bovino, se demostró que LOX-1 media la endocitosis de células seniles/apoptóticas, y que esta unión es inhibida por LDLox y por fosfatidilserina (PS) un fosfolípido característico de células apoptóticas y que actúa como factor pro-coagulante, favoreciendo el proceso aterosclerótico-trombótico por la presencia de LDLox y la consecuente disminución de la endocitosis de células sanguíneas apoptóticas del plasma [112]. En este proceso apoptótico, en cultivos de células endoteliales de aorta carotidea humana (HCAECs), se determinó la participación de  $\text{NF-}\kappa\beta$ , cuya activación mediada por LDLox fue bloqueada al preincubar las células con un ARN antisentido para LOX-1 [114].

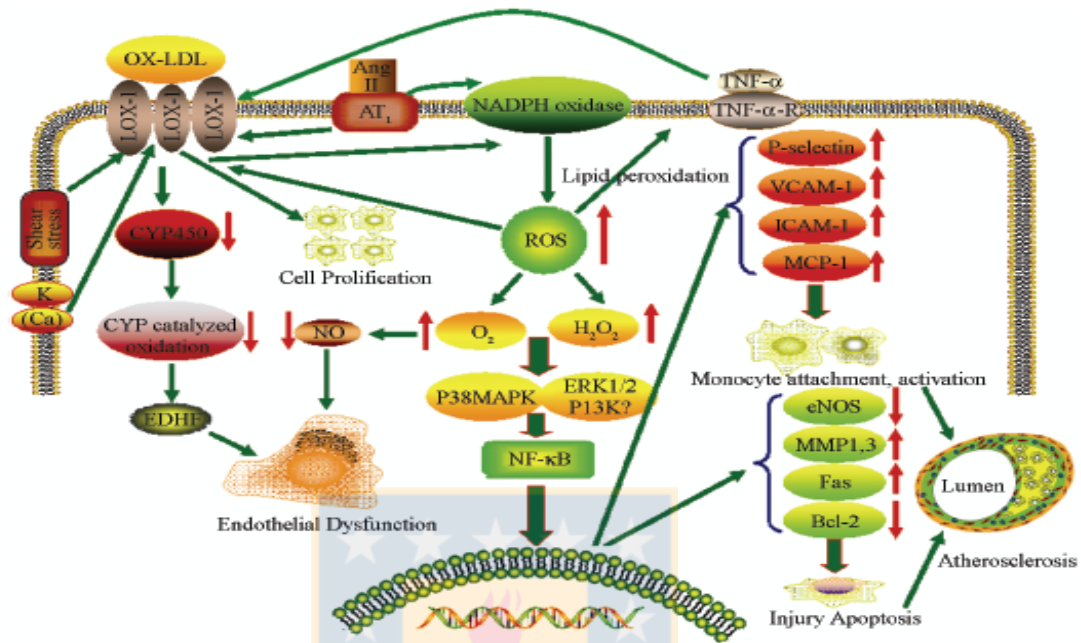
A nivel regulatorio se determinó que una serie de citoquinas pro-inflamatorias, lisofosfolípidos y otras moléculas generan un aumento de expresión de LOX-1. Lisofosfatidilcolina (LPC), un lisofosfolípido constituyente mayoritario de las LDLox (40% del total de los fosfolípidos presentes en las LDLox, formado en los procesos oxidativos de modificación las LDLs [115]), es capaz de inducir la expresión de LOX-1 a nivel de ARNm y proteína en células de endotelio de aorta de bovino (BAEC) en forma tiempo y dosis dependiente. Este fenómeno es inhibido por el uso de un anticuerpo específico contra la región de unión a ligando de LOX-1 [116].

Otro inductor de expresión de LOX-1 es  $\text{TNF-}\alpha$ , la regulación de LOX-1 por  $\text{TNF-}\alpha$  y ésteres de forbol miristato ha sido estudiada a nivel de proteína y ARN mensajero, mostrando un aumento de la expresión de una manera concentración dependiente [117].

Se sugirió que la activación de LOX-1 puede inducir varias vías de señalización intracelular, incluidas proteínas quinasas y factores de transcripción, que regulan la expresión de genes relacionados con la aterosclerosis. Estas vías inducidas por LDLox

incluyen p38 (MAPK) [118], p44/42 MAPK, proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa B (PKB), proteína tirosina quinasa (PTK), factor de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 [119], la activación de las GTPasas Rho y Rac [120](Fig. 9). La expresión LOX-1 y las vías de señalización activadas por este receptor pueden aumentar la proliferación y motilidad celular, además de incrementar la generación de moléculas proinflamatorias y la secreción de metaloproteinasas [120-122]. Por tanto, la activación del receptor LOX-1 por LDLox se asocia a una gran cantidad de patologías tales como daño cardiovascular, aterosclerosis, dislipidemia, hipertensión, isquemia miocárdial, injuria por isquemia reperfusión, complicaciones cardiovasculares por diabetes, cuadros infecciosos e inflamatorios [105].





**Figura 9: Vías de transducción de señales e importancia fisiopatológica de LOX-1.** LDLox, TNF- $\alpha$ , estrés vascular, ROS, ET1 y Ang II aumentan la expresión de LOX-1. La unión de LDLox a LOX-1 activa a la NADPH oxidasa en la membrana celular a través de mecanismos aún desconocidos que se traducen en el rápido aumento de ROS intracelular incluyendo  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . El aumento de  $O_2^-$  da como resultado la disminución intracelular de óxido nítrico (NO). La activación de LOX-1 también podría disminuir la actividad de CYP450, lo que causaría la disminución de EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor). Tanto la disminución de NO y EDHF podría causar disfunción de las células endoteliales. NF- $\kappa$ B es activado a través de vías de señalización p38MAPK, ERK 1/2 y PI3K. También existe un aumento en la expresión de P-selectina, VCAM, ICAM-1 y MCP-1, resultando en la activación y adhesión de monocitos. La expresión de eNOS y Bcl-2 se redujeron, mientras que la expresión de MMP-1, 3, 9 y Fas aumentaron, las cuales causan lesión y apoptosis de células endoteliales. La fagocitosis de LDLox hace que los macrófagos se conviertan en células de espuma. La unión de LDLox a LOX-1 puede activar a PPAR- $\gamma$ , resultando en la expresión de VEGF. La activación de LOX-1 también puede conducir a la proliferación celular [105].

### 1.5.3 LOX-1 y su relación con procesos de angiogénesis e invasión tumoral.

En el cáncer existen pasos fundamentales en la progresión tumoral, el primer paso es la transformación maligna de una célula, lo que ocurre por acumulación de mutaciones en genes específicos que otorgan nuevas propiedades o sellos, luego se da lugar a un crecimiento pre-neoplásico, que involucra una hiperplasia del tejido hasta establecerse un carcinoma *in situ* y por último la metástasis en donde se establece un cáncer de carácter invasivo [123] [124]. La metástasis se describe como un proceso que media la migración de las células tumorales desde el sitio de iniciación a órganos distantes [125]. En este sentido la adhesión y migración de células tumorales desde el tumor primario al torrente sanguíneo, su adhesión a la pared endotelial y la posterior transmigración endotelial es esencial en el proceso metastásico [126].

Dentro de los mecanismos moleculares necesarios para la generación de metástasis se encuentran: la angiogénesis, invasión local y diseminación de células tumorales al estroma circundante en un proceso conocido como transición epitelio mesenquimal (EMT) [126].

La angiogénesis es un proceso fisiológico que determina la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes [127]. La angiogénesis ocurre naturalmente en embriogénesis, crecimiento del organismo y cicatrización de heridas, pero también es un proceso fundamental en la progresión tumoral [128]. Diversos estudios señalan que los tejidos cancerosos presentan una mayor vascularización en comparación con los tejidos normales [129]. Esto ya que las células malignas son muy activas metabólicamente y el proceso provee al tumor de un mayor aporte de nutrientes y oxígeno, además de facilitar la invasión de las células tumorales promoviendo la diseminación de células malignas a órganos distantes [130]. Estímulos

como la hipoxia, secreción de citoquinas y el estrés oxidativo pueden aumentar la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en las células tumorales [131]. El factor inducible por hipoxia (HIF-1), uno de los mayores inductores de la producción de VEGF, también activa rutas de estrés oxidativo e inflamación a través de NF-kB aumentando la generación de angiogénesis. En estas condiciones la generación de ROS también se incrementan en el tejido tumoral, así las ROS funcionan como moléculas capaces de iniciar y/o modular la angiogénesis en el tumor [132].

La transición epitelio mesenquimal es un proceso complejo en el que las células originalmente epiteliales pierden sus características y adquieren un fenotipo mesenquimal. En este proceso existen cambios drásticos en el fenotipo celular generando la pérdida de interacciones célula-célula así como la pérdida de la polaridad apico-basal y una drástica reorganización de citoesqueleto [133]. La pérdida de expresión de E-cadherina es uno de los cambios iniciales para la EMT y es considerado un marcador primordial de este proceso [134]. Como E-cadherina tiene un rol esencial en la homeóstasis epitelial, la disminución en su expresión inicia el descenso en la expresión y/o organización de una serie de marcadores epiteliales adicionales, como proteínas desmosomales (plakoglobina, desmoglobinas, desmoplaquinas), uniones ocluyentes, (ZO-1) y componentes de la polaridad celular (proteínas dlg o lgl) [135]. Concomitantemente, existe un aumento en la expresión de proteínas de células mesenquimales como por ejemplo vimentina, fibronectina y N-cadherina así como de enzimas remodeladoras de la matriz extracelular (metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9) [136]. Además, en este proceso de cambio a características mesenquimales la célula sufre una reorganización drástica del citoesqueleto y las interacciones célula-matriz para facilitar los procesos de

motilidad en estos nuevos fenotipos celulares. Así, se describe que las células que adquieren características mesenquimales durante la EMT son capaces de movilizarse a través de la reestructuración y redistribución dinámica del citoesqueleto mediada por la activación de las GTPasas Rho, Rac y Cdc32 [137]. La EMT se describe como un proceso relevante en la progresión tumoral no solo implicado en la invasión tumoral sino también durante la metástasis y en resistencia terapéutica del cáncer [138]. Durante la invasión de un carcinoma, la EMT provee a las células tumorales la capacidad de disociarse una de otra, degradar y migrar dentro de la membrana basal e invadir el tejido conectivo adyacente [139]. Interesantemente, el proceso inverso, conocido como transición mesenquimal epitelial, es también esencial en la embriogénesis y juega un rol determinante en el establecimiento de células tumorales en nuevos órganos en la metástasis tumoral [140]. La combinación de esta data refuerza el concepto que la EMT puede considerarse como un proceso dinámico y en muchas instancias, un evento reversible durante la progresión tumoral [141].

Por otra parte, en estudios comparativos entre pacientes obesos y pacientes normo lipémicos se determinó que pacientes obesos poseen altos niveles de leptina, VEGF, PAI-1, interleukina-6 (IL-6), oxLDL y bajos niveles de testosterona. La administración de sueros de ratones obesos en líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, PacMetUT1 y DU145 induce un aumento en la invasión, migración y actividad de metaloproteinasas de matriz, en conjunto con la generación de un EMT. Esto demuestra que los factores presentes en circulación de ratones obesos son capaces de favorecer la progresión tumoral en cáncer de próstata a través de la generación de una EMT [142].



Resultados recientemente publicados de nuestro laboratorio demuestran que la activación de LOX-1 por LDLox incrementa la expresión de marcadores pro-angiogénicos como VEGF, MMP-2 y MMP-9. En este sentido se determinó que la expresión de estas moléculas es potenciada en células C4-2/LOX-1(+) y de forma interesante esto es prevenido en el modelo celular C4-2 knock-down para LOX-1. La utilización de líneas celulares C4-2/LOX-1(+) y C4-2/LOX-1(-) en xenografts sobre membranas corioalantoideas de embriones de pollo, demostraron que LDLox/LOX-1 genera un aumento en la angiogénesis del estroma asociado al tumor y su vascularización, y que la ausencia del receptor LOX-1 disminuye el recuento de vasos sanguíneos asociados al tumor [143].

#### **1.5.4 LOX-1/LDLox y su relación con la progresión del cáncer de próstata**

La alta incidencia de algunos tipos de cáncer como el cáncer de próstata, se localizan mayoritariamente a países desarrollados y en vías de desarrollo. Hábitos conductuales presentes en la sociedad actual como: el consumo de tabaco y dietas hipercalóricas son sindicados como factores de riesgo en el desarrollo de cáncer [144]. Existen numerosas relaciones entre la aterogénesis y tumorigénesis, especialmente respecto a su origen a partir de trastornos metabólicos [145]. La obesidad se asocia como un factor de riesgo en muchos tipos de patologías, destacando entre ellas la aterosclerosis, diabetes mellitus tipo 2 y el cáncer [146]. Estudios de correlación demostraron una asociación entre el aumento en los niveles LDLox en pacientes obesos y un incremento en el riesgo de desarrollar metástasis en cáncer de próstata [147]. La obesidad se asocia con un incremento importante del riesgo de desarrollar cáncer de próstata [148]. Además, la obesidad juvenil presenta correlación positiva con

el aumento en el riesgo de desarrollo este mismo cáncer [149]. Pacientes diagnosticados con síndrome metabólico, enfermedades inflamatorias crónicas y condiciones de autoinmunidad muestran una alta incidencia, agresividad y estabilidad tumoral [150]. Sin embargo, varios de los fármacos recomendados para el tratamiento de desordenes del metabolismo lipídico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, como sulindac, tocilizumbam, simvastatina, cerulenina y metformina inhiben la progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer [151]

La inflamación es un factor comúnmente asociado con la aparición de cáncer y su progresión. Las moléculas inflamatorias están elevadas en muchos tipos de cáncer y proveen señales de crecimiento que promueven la proliferación de células malignas [152]. Estudios en modelos murinos evidencian que el factor de transcripción NF- $\kappa$ B media la respuesta inflamatoria en la conversión y proliferación de células malignas [153, 154]. Se demostró que LOX-1 está sobre-expresado en pacientes obesos, desempeñando una función determinante en la activación de señales pro-inflamatorias, proliferativas y angiogénicas que contribuyen al inicio y progresión de la aterosclerosis [155-157]. Así mismo, las vías de señalización involucradas en la activación del receptor LOX-1 por LDLox son compartidas en la progresión, angiogénesis y metástasis tumoral [158]. Estudios desarrollados por Khaidakov y col. en el año 2011 mostraron perfiles transcripcionales comunes entre enfermedades como el cáncer, obesidad, aterosclerosis y síndrome metabólico. Además, demostraron que el gen de LOX-1 humano (*olr-1*) es un componente fundamental en la mantención, transformación y desarrollo de diferentes líneas celulares cancerígenas. Así mismo la interacción del receptor LOX-1 con su ligando LDLox activa vías de señalización que inician la transcripción de proteínas involucradas en procesos inflamatorios,

proliferación y transformación celular por medio de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B [159].

Análisis de expresión de ARNm para LOX-1 mostraron la alta expresión de este receptor en carcinomas prostáticos humanos en estadios clínico patológico III y IV, los cuales se caracterizan por aumento en la invasión tumoral local, incremento en la vasculatura y en el caso del estadio IV el desarrollo de metástasis [160]. Análisis de la expresión de genes relacionados con la transformación celular realizados en ratones K.O y silvestres para LOX-1 revelaron que 25 de los 238 genes sobre-expresados durante la transformación celular se inhiben en más del 20% en los tejidos de ratones K.O para LOX-1. Así, la expresión de estos 25 genes dependientes de LOX-1 están asociados a apoptosis, proliferación, cicatrización de heridas, angiogénesis, defensa inmune y poseen secuencias de reconocimiento en sus promotores para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B [159].

Resultados previos obtenidos en el laboratorio demostraron, por primera vez, la expresión de ARNm para LOX-1 en células de cáncer de próstata DU-145. Ensayos de inmunocitoquímica indican que LOX-1 se expresa principalmente a nivel de membrana celular e internaliza LDLox de forma específica, dosis y tiempo dependiente [161].

Otros hallazgos de nuestro grupo de investigación demostraron por medio de ensayos funcionales que, células DU-145 al internalizar altas concentraciones de LDLox, pierden adhesión sin afectar la viabilidad celular, proceso que se inhibe al bloquear selectivamente el receptor LOX-1 con un anticuerpo contra el sitio de unión a ligando de LOX-1. La pérdida de adhesión celular se relaciona a fenómenos previos a la metástasis, donde la célula epitelial se transforma a un morfotipo celular migratorio e

invasivo, proceso conocido como: transición epitelio-mesenquimal (EMT). Al activar el receptor LOX-1, se produce una remodelación y redistribución de proteínas del citoesqueleto y adhesiones focales generando morfotipos celulares móviles con alta capacidad invasiva [162].



## 2 Pregunta de Investigación

Los tratamientos actuales para el CaP si bien controlan parcialmente la progresión del CaP, lo hacen a expensas de una serie de efectos adversos que deterioran la calidad de vida de los pacientes. Son tratamientos que no sólo afectan a las células tumorales, sino también a las células normales de la próstata e incluso causan daño a nivel sistémico. Sin embargo, no existe una terapia que implementándose de manera única o combinada reduzca la progresión tumoral y a la vez minimice los efectos adversos. Considerando que los resultados de nuestro laboratorio han demostrado la función del receptor LOX-1 en el desarrollo de angiogénesis en cáncer de próstata es que planteamos la siguiente pregunta de investigación:

**¿Se podría reducir el crecimiento tumoral en modelo celular de cáncer de prostata utilizando vectores adeno-asociados que medien la transducción celular de shARN dirigidos contra el receptor LOX-1?.**

### 3 Hipótesis

La transducción de shARNs dirigidos contra el receptor LOX-1, mediante el empleo de vectores adeno-asociados, reduce la tasa de crecimiento tumoral en modelo celular de cáncer de próstata.



#### 4 Objetivo general

Evaluar el crecimiento en modelo celular de cáncer de próstata, transducido con vectores adeno-asociados que median la expresión de ARN de silenciamiento contra el gen *OLR-1*.



## 5 Objetivos específicos

- 1- Generar vectores adeno-asociados incompetentes para la replicación que contengan secuencias de expresión para shARN contra el receptor LOX-1 y marcadores de selección basados en la proteína fluorescente infrarroja.
- 2- Evaluar la funcionalidad de los vectores adeno-asociados para transducir modelo celular de cáncer de próstata y reducir la expresión del receptor LOX-1 manteniendo la expresión del marcador de fluorescencia IRFP.
- 3- Determinar la expresión relativa de marcadores de progresión tumoral como E-cadherina, Vimentina, VEGF, MMP-2 y MMP-9, mediante PCR-en tiempo real y *western blot* en los modelos celulares tratados con los vectores adeno-asociados diseñados.
- 4- Evaluar el crecimiento tumoral en *xenograft* de células de cáncer de próstata, transducidas con los vectores adeno-asociados, en modelos murinos inmunodeficientes.



## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Soluciones

- **TAE:** Tris-acetato 400 mM (Merck, Alemania), EDTA 1 mM (SIGMA, EE.UU.), pH 7,9.
- **Solución de bloqueo:** albúmina de suero bovino (BSA) 5% (SIGMA, EE.UU.), diluida en tampón PBS.
- **Solución de Rojo Ponceau:** Ponceau S 20 g/L (SIGMA, EE.UU.); ácido tricloroacético (TCA) 300 g/L (SIGMA, EE.UU.), ácido sulfosalicílico 300 g/L (Merck, Alemania).
- **Azul de Tripán:** Colorante para el conteo de células, tripán azul 5 g/L (SIGMA, EE.UU.), NaCl 8,5 g/L (Merck, Alemania).
- **Tripsina-EDTA:** tripsina 2,5 g/L (GIBCO-Invitrogen, EE.UU.), glucosa 1,01 g/L (Fluka, Alemania), rojo fenol 1%, EDTA 0,1 g/L (SIGMA, EE.UU.).
- **Tris-Glicina:** Tampón de corrida de proteínas, glicina 144 g/L (Merck, Alemania), Tris base 30 g/L (Merck, Alemania), SDS 0,1% (Caledon, Canadá), pH 8,3.
- **Solución PEI:** Solución para transfección en células superiores, polietilenimina (PEI 25 kDa, Aldrich, EE.UU.) 0,81 mg/mL pH 6,8-7,2.
- **Solución de glucosa:** Solución para transfección en células superiores, glucosa 5% (SIGMA, EE.UU.).
- **Soluciones de purificación de ADN plasmidial:**
  - P1: 50 mM de Tris-HCl pH=8; 10mM EDTA
  - P2: 200 mM de NaOH; SDS 1%
  - P3: 3.0 M de acetato de potasio-ácido acético pH=5.5

## 6.2 Soluciones Buffers

- **PBS:** Tampón fosfato-salino, NaCl 136 mM; KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH = 7,4.
- **PBS-Tween:** Solución de lavado, tween-20 0,05% (SIGMA, EE.UU.), disuelto en PBS.
- **TBS:** Tris base 2,42 g/L, NaCl 8,0g /L, ajustar pH 7,6
- **Solución tampón de transferencia para Western blot:** Tris base 5,8 g/L (Merck, Alemania), glicina 2,9 g/L (Merck, Alemania), Metanol 20% (Caledon, Canadá), pH 9,2.
- **Solución tampón denaturante:** glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto-etanol 5%, Tris-base 0.0625 g/L, azul de bromofenol 0.001%, pH 6.8
- **Buffer RIPA:** 20 mM Tris-HCl pH 7.5 , 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 2.5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM β-glicerofosfato, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 μg/mL leupeptina.

## 6.3 Vectores plasmídicos

- **pAAV-DJ:** vector de 7,3 kb que suministra genes *in trans* para la producción de vectores AAV mediante el sistema AAV-DJ-Helper Free Packaging System (Cell Biolabs Inc., EE.UU.). Contiene en orden 5' a 3' una unidad transcripcional del gen de β-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, el gen AAV-2 rep y el gen AAV-2 cap, ambos del virus adenoasociado de serotipo 2.
- **pAAV- Helper:** vector ayudante de 11,6 kb que suministra genes de adenovirus *in trans* necesarios para la producción de vectores AAV mediante el sistema AAV-DJ-Helper Free Packaging System (Cell Biolabs Inc., EE.UU.). Contiene de 5' a 3' el

gen que confiere resistencia a ampicilina, el gen Adeno VA, el gen Adeno E4 y el gen Adeno E2A.

- **pAAV-GFP:** vector de transferencia génica de 5,4 kb para fabricación de vectores AAV que permitan la expresión de GFP mediante el sistema AAV-DJ-Helper Free Packaging System. Contiene de 5' a 3' la secuencia izquierda 5' ITR, el promotor CMV, la secuencia correspondiente al intrón de  $\beta$ -globina humana, el gen para expresión de GFP, la secuencia codificante para la señal de secreción del activador tisular del plasminógeno humano (htPA), la secuencia derecha 3' ITR y el gen que codifica para  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina.

#### 6.4 Kits comerciales

- **Kit de extracción de ADN:** EZNA (Eazy Nucleic Acid Isolation) Gel Extraction, OMEGA, Bio-tek (GA, EEUU).
- **Kit de purificación de ADN a escala masiva:** Qiagen Plasmid Midi and Maxi Purification Kits (Hilden, Alemania).
- **Kit PCR tiempo real:** Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix, Agilent Technologies (CA, EEUU).
- **Kit para cuantificación de proteínas:** Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific (MA, EEUU).

## 6.5 Protocolo cultivo celular

La línea celular HEK 293 AAV fue obtenida de *Cell Biolabs Inc.* (San Diego, CA) y la línea HeLa y C4-2B se obtuvieron del *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Md.).

- **HEK-293 AAV.** La línea celular derivada de riñón embrionario humano HEK-293, fue generada a partir de la transformación de células de riñón de embrión humano con un adenovirus del tipo 5. Las células HEK-293 se cultivaron en medio DMEM, suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina (4 mM), estreptomycin-penicilina al 1% y piruvato 1 mM. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en un ambiente húmedo con CO<sub>2</sub> al 5%.
- **HeLa.** La línea celular humana HeLa fue aislada desde una muestra de adenocarcinoma cérvico-uterino. Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM, suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina (4 mM), estreptomycin-penicilina al 1% y piruvato 1 mM. Los se mantuvieron a 37°C en un ambiente húmedo con CO<sub>2</sub> al 5%.
- **C4-2B.** La línea celular humana C4-2B fue aislada a partir de metástasis óseas de xenoinjertos ortotópicos prostáticos de células de C4-2 en ratones *Nude* castrados. Esta línea celular se cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-gentamicina al 1% y L-glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos mantuvieron a 37°C en un ambiente húmedo con CO<sub>2</sub> al 5%.

## 6.6 Protocolo de animales de experimentación.

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

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

## 6.7 Obtención de LDL.

La LDL se obtuvo desde plasma humano de sangre venosa de voluntarios normolipémicos y normoglicémicos con ayuno estricto de 10 horas, utilizando como anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (EDTA, 1 mg/mL) y preservante de Alaupovic (ácido  $\epsilon$  aminocaproico 1M, EDTA 10%, glutatión 5%, penicilina 10000 U/mL, estreptomicina sulfato 1000  $\mu$ g/mL) en proporción 1:100. El plasma se separó de la sangre total por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cuál se formó un *pool* de plasma. El *pool* de plasma obtenido se sometió a ultracentrifugación diferencial con bromuro de potasio (KBr) [163], por ajuste de densidad entre 1,019 y 1,063 g/mL, con lo cuál se aisló la fracción de LDL contenida en el plasma. El plasma de densidad 1,06 g/mL se centrifugó a 40000 rpm por 20 horas a 16°C. La fracción que contenía las VLDL y quilomicrones fue descartada y el infranadante se ajustó a densidad 1,063 g/mL con KBr según la fórmula:

$$gKBr = ((Df-Di) \times V) / (1-(Df \times 0.315))$$

Donde Df: Densidad final (g/mL), Di: Densidad inicial (g/mL) y V: Volumen de plasma (mL)

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

El contenido proteico de la fracción de LDL se determinó por el método de Lowry modificado para lipoproteínas, utilizando como patrón albúmina de suero de bovino (BSA). Se realizó una curva de calibración con BSA en concentraciones entre 100 y 500 µg/mL para establecer el rango lineal de detección. Los estándares y las muestras fueron diluidas en agua en un volumen final de 50 µL; se les adicionó 500 µL de reactivo de Lowry modificado (NaOH 0,8 N, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O 0,2%-tartrato de sodio y potasio 0,4%, SDS 10 % y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se adicionó 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 75% diluido 1/5 en agua destilada y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. La absorbancia de las muestras fue medida a λ 750 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1001.

#### **6.7.1 Generación de LDL oxidada.**

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

### **6.7.2 Determinación del cambio de movilidad electroforética de la LDLox.**

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

### **6.7.3 Determinación de la concentración de malondialdeído MDA en LDLox.**

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



concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción del complejo MDA-TBA ( $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) y los resultados se expresaron como nmoles de MDA/mg de proteína.

#### **6.7.4 Construcción del plásmido de transferencia adeno-asociado pAAV/IRF682.**

Para la construcción del vector pAAV/IRF682 se utilizó la secuencia que codifica para la Proteína Fluorescente Infrarroja 682 (IRFP682) procedente del plásmido pIRFP 682-N1 facilitado por Vladislav Verkhusha (Addgene plasmid # 45459, Cambridge, MA). El vector fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *NotI* (New England Biolabs,UK), para liberar el fragmento que codifica para la IRFP682. El vector de empaquetamiento pAAV/GFP (Cell Biolabs Inc. San Diego, CA) fue digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *HincII* (New England Biolabs,UK) para eliminar el fragmento correspondiente a la secuencia de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) y mantener el fragmento de mayor tamaño que corresponderá al esqueleto completo del plásmido sin la secuencia para la GFP. El correcto subclonamiento fue analizado a través de la digestión con las endonucleasas de restricción *EcoRV* y *NotI* (New England Biolabs,UK).

El subclonamiento se inició realizando la digestión de 5  $\mu\text{g}$  del plásmido pAAV/GFP (Cell Biolabs Inc. San Diego, CA) a 37°C utilizando las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HincII* (10 Unidades de cada una de las enzimas) en tampón NEB3 y BSA 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Paralelamente, 5  $\mu\text{g}$  del plásmido pIRFP 682-N1 (Addgene, Cambridge, MA) fue digerido a 37°C utilizando la endonucleasa de restricción *NotI* (10 Unidades) en tampón NEB3 en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . Posteriormente el plásmido pIRFP 682-N1 digerido con *NotI*, es roado con 6 unidades

de la enzima T4 DNA polimerasa (New England Biolabs,UK), en tampón NEB2 adicionando 100  $\mu$ M de dNTPs y BSA 1  $\mu$ g/mL. El plásmido fue purificado adicionando 1 volumen de con Fenol/cloroformo, luego centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, se extrajo la fase superior y el ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol 100% (v/v) y 0,1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M, se incubó por 30 minutos a -20°C, luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 12 minutos y se desechó el sobrenadante, a continuación se lavó el pellet con etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 12.000 rpm por otros 10 minutos, finalmente se eliminó el sobrenadante y el pellet fue re-suspendido en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de Biología Molecular. El vector pIRFP 682-N1 linealizado, fue digerido con 10 unidades de la enzima *EcoRI*, en tampón NEB3 en un volumen final de 50  $\mu$ L. La correcta digestión de los plásmidos se comprobó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0.1% v/v.

Los productos de cada ensayo de restricción fueron purificados desde un gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio al 0,1% para la visualización del DNA mediante el sistema de detección UVIsave HD5 Uvitec (Cambridge, U.K). Los fragmentos de interés (pAAV e IRFP682) fueron extraídos desde un gel de agarosa al 1% y posteriormente purificados con el kit de purificación (E.Z.N.A.® Gel Purification Kit, EEUU). El DNA fue eluido en 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. La cuantificación de los productos de digestión se realizó mediante espectrofotometría a  $\lambda$  260 nm. El extremo cohesivo del fragmento cortado con *NotI*, del plásmido pIRFP682, fue romado usando la enzima T4 DNA polimerasa (New England Biolabs,UK). El fragmento del plásmido pAAV purificado se desfosforiló, con la enzima Fosfatasa Antártica (New England Biolabs,UK). Finalmente ambos fragmentos fueron ligados, para ello el vector y el inserto purificados se mezclaron en una relación molar 1:3 con la T4 DNA ligasa (1U) (New England

Biolabs,UK) y el tampón de ligación 10X de la enzima, en un volumen final de 20  $\mu$ L, la reacción fue incubada a 17°C por 16 horas. El correcto sub-clonamiento se supervisó por medio de ensayos de restricción.

### **6.8 Construcción del plásmido de transferencia adeno-asociado para expresión de shARN contra el gen *OLR-1*.**

Para la construcción del plásmido pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* se utilizó el plásmido pLU6W/shARN-*OLR-1* (generado en laboratorio de Biotecnología y Biofármacos) el cual fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *EcoRV* para obtener el fragmento que correspondiente al shARN contra el gen *OLR-1* bajo la secuencia del promotor U6. Por su parte el plásmido pAAV/IRF682 generado, fue linealizado con la enzima *PmlI* con el fin de subclonar en él la banda U6/shARN.

El subclonamiento se inició realizando la digestión de 5  $\mu$ g del plásmido pLU6W/shARN *OLR-1* a 37°C utilizando las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *EcoRV* (10 Unidades de cada una de las enzimas) en tampón NEB3 y BSA 1  $\mu$ g/mL en un volumen final de 50  $\mu$ L. Simultáneamente, 5  $\mu$ g del plásmido pAAV/IRFP682 fue digerido a 37°C utilizando la endonucleasa de restricción *PmlI* (10 Unidades) en tampón NEB1 y BSA 1  $\mu$ g/mL en un volumen final de 50  $\mu$ L. La correcta digestión de los plásmidos se comprobó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0.1% v/v.

Los productos de cada ensayo de restricción fueron purificados desde un gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio al 0,1% para la visualización del DNA mediante el sistema de detección UVIsave HD5 Uvitec (Cambridge, U.K). Los fragmentos de interés (pAAV/IRF682 lineal y U6 shARN-*OLR-1*) fueron extraídos desde un gel de agarosa al 1% y posteriormente purificados con el kit de purificación (E.Z.N.A.® Gel Purification

Kit, EEUU). El DNA fue eluido en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. La cuantificación de los productos de digestión se realizó mediante espectrofotometría a  $\lambda$  260 nm. El fragmento del plásmido pAAV/IRF682 purificado se desfosforiló, con la enzima Fosfatasa Antática (New England Biolabs,UK), y el extremo cohesivo del fragmento U6-shARN-*OLR-1* fue romado usando la enzima T4 DNA polimerasa (New England Biolabs,UK).

Finalmente los fragmentos de interés fueron ligados, para ello el vector y el inserto purificados se mezclaron en una relación molar 1:3 con la T4 DNA ligasa (1U) (New England Biolabs,UK) y el tampón de ligación 10X de la enzima, en un volumen final de 20  $\mu$ L, la reacción fue incubada a 17°C por 16 horas. El correcto subclonamiento se supervisó por medio de ensayos de restricción.

#### **6.9 Construcción del plásmido de silenciamiento adeno-asociado pAAV/shARN-*OLR-1*.**

Para la generación del plásmido pAAV/shARN-*OLR-1* se utilizó el plásmido pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1*, del cual se extrajo el fragmento que incluía las secuencias del promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (pCMV) y la secuencia que codificaba para la proteína trazadora iRFP682. Para esto 5  $\mu$ g del plásmido pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* fueron digeridos a 37°C utilizando las endonucleasas de restricción *Nco*I y *Eco*RV (10 Unidades de cada una de las enzimas) en tampón NEB3 y BSA 1  $\mu$ g/mL en un volumen final de 50  $\mu$ L. La correcta digestión de los plásmidos se comprobó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0.1% v/v. El fragmentos de interés (pAAV/U6-shARN-*OLR-1*) se extrajo desde un gel de agarosa al 1% y posteriormente purificado con el kit de purificación (E.Z.N.A.® Gel Purification Kit, EEUU). El DNA fue eluido en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Luego

el extremo cohesivo del fragmento pAAV/U6-shARN-OLR-1 fue romado usando la enzima T4 DNA polimerasa (New England Biolabs,UK). Finalmente el ADN se ligó con la T4 DNA ligasa (1U) (New England Biolabs,UK) y el tampón de ligación 10X de la enzima, en un volumen final de 20  $\mu$ L, la reacción fue incubada a 17°C por 16 horas. El correcto sub-clonamiento se supervisó por medio de ensayos de restricción.

#### **6.10 Transformación de bacterias competentes.**

Un volumen de 10  $\mu$ L de cada producto de ligación fue dializado contra agua destilada en filtros de nitrocelulosa (0,025  $\mu$ m de 13 mm, Millipore) por 20 minutos. Para la transformación se utilizó el método de electroporación, se descongelaron en hielo 50  $\mu$ L de bacterias electro-competentes *Escherichia coli* Top 10 (invitrogene, EEUU), se mezclaron con 5  $\mu$ L de la reacción de ligación y se incubaron durante 5 min. Las bacterias se electroporaron en cubetas de 2 mm en el equipo *Micropulser* (BioRad, EEUU). Las bacterias transformadas fueron incubadas con 300  $\mu$ L de medio LB por 1 hora en agitación constante a 37°C. Finalmente, las bacterias fueron plaqueadas en placas LB/Ampicilina (60  $\mu$ g/ $\mu$ L) e incubadas a 37°C por 16 horas. Las colonias crecidas en las placas fueron seleccionadas utilizando un asa redonda y se sembraron en 5 mL de medio LB con ampicilina, dejando las bacterias en agitación constante durante 12 horas a 37°C para ser purificadas a escala mini preparativa.

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

Un mililitro de cada uno de los caldos de cultivos de las colonias crecidas desde la transformación del producto de ligación fueron centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió mediante vórtex en 100  $\mu$ L de buffer P1 (liso-, RNasa 10 $\mu$ g/mL), hasta garantizar la mezcla total de las

bacterias. Luego, se añadió 100 µL de solución II P2 (NaOH+SDS), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente se agregó 100 µL de solución III P3 (KAc+HAc) y se mezcló fuertemente para luego incubarlo en hielo por 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min. Aproximadamente 300 µL de sobrenadante fue colectado en un tubo cónico de 1,5 mL y se le añadió 1 volumen de isopropanol (aproximadamente 300 µL) y la muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y el *pellet* de ADN se secó a temperatura ambiente para ser resuspendido en 20 µL de H<sub>2</sub>O de biología molecular.

#### **6.12 Análisis de colonias positivas para el producto de ligación**

- **Ligación para obtención del plásmido pAAV/IRF682:** Los ADNs obtenidos desde las purificaciones de ADN plasmídico a escala mini preparativa fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *NotI* (1 unidad de cada enzima) en buffer de reacción NEB3 con BSA 1 µg/mL por 3 horas.

- **Ligación para obtención del plásmido pAAV/IRF682/shARN-OLR-1:** Los ADNs obtenidos desde las purificaciones de ADN plasmídico a escala mini preparativa fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *NdeI* (1 unidad de cada enzima) en buffer de reacción NEB 4 por 3 horas.

- **Ligación para obtención del plásmido pAAV/shARN-OLR-1:** Los ADNs obtenidos desde las purificaciones de ADN plasmídico a escala mini preparativa fueron digeridos con la enzima de restricción *NdeI* (1 unidad) en buffer de reacción NEB 4 por 3 horas. Las colonias positivas para cada uno de los productos de ligación fueron seleccionadas y 1 mL de cada uno de los cultivos fueron transferidos a un matraz erlenmeyer

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

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

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

Para la transfección de células de mamíferos los plásmidos se purificaron mediante el Kit de reactivos “Qiagen Plasmid Midi and Maxi Purification Kits” (Qiagen, EE.UU). El ADN final se resuspendió en H<sub>2</sub>O de grado de biología molecular y su concentración se obtuvo mediante espectrofotometría.

#### **6.14 Determinación de la funcionalidad y eficiencia de silenciamiento de los plásmidos que median la expresión del shARN contra el gen *OLR-1*.**

Para determinar la eficiencia del silenciamiento de cada uno de los plásmidos que codifican el shARN para LOX-1, se utilizó como modelo de estudio la línea celular HeLa la cual expresa de manera constitutiva el receptor LOX-1 y se puede transfectar de manera óptima con Lipofectamina® 2000 (Thermo Fisher Scientifics Inc. Waltham, MA). Aproximadamente  $6 \times 10^5$  células HeLa con un 70% de confluencia fueron transfectadas con 2  $\mu\text{g}$  de DNA de cada uno de los 5 vectores generados, y se visualizó la expresión de la proteína fluorescente infrarroja 682, mediante escaneo de las placas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISEY CLX, LI-COR (Texas, EEUU) y se determinó también LOX-1 por PCR en tiempo real y *western-blot*. Los plásmidos con la secuencia de shARN que presentaron mayor eficiencia de inhibición se seleccionaron para la generación de partículas virales adeno-asociadas.

#### **6.15 Generación de partículas virales adeno-asociadas.**

##### **6.15.1 Transfección de HEK-293AAV con poli-etilenimina para producción de partículas virales adeno-asociadas.**

Se sembraron  $1 \times 10^7$  células HEK-293AAV en placas de 150 mm (TPP Techno Plastic Products AG, Suiza) a una confluencia aproximada del 40% y se cultivaron en medio de crecimiento DMEM 10% de suero fetal bovino a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 95% hasta alcanzar una confluencia celular del 80%. 2 horas antes de comenzar la transfección se lavaron las células 2 veces con PBS y cambió el medio de crecimiento por medio DMEM sin SFB, y se continuó el cultivo en las condiciones anteriores.



Cada placa fue transfectada con 75  $\mu\text{g}$  de ADN total (25  $\mu\text{g}$  de cada plásmido pAAV/IRF682 o pAAV/IRF682/shARN-OLR-1, y de los plásmidos pAAV-DJ y pAAV-Helper) re-suspendidos en un volumen final de 750  $\mu\text{L}$  de solución de glucosa 5% (p/v), se mezcló vigorosamente la suspensión y se dejó reposar por 10 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Paralelamente se prepararon 112  $\mu\text{L}$  de PEI ramificado de 25 kDa (Sigma Aldrich, EEUU) (1,5  $\mu\text{g}$  de PEI por 1  $\mu\text{g}$  de ADN) por placa, ajustando un volumen final de 750  $\mu\text{L}$  con solución de glucosa 5% (p/v), se mezcló vigorosamente la solución y se dejó reposar por 10 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Pasado este tiempo se añadió el PEI al ADN e inmediatamente se mezcló vigorosamente durante 2 min y se dejó reposar a 25 $^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos. Luego, se adicionó medio DMEM a la mezcla de transfección y esta se añadió suavemente sobre la capa celular. El cultivo celular se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$  durante 6 horas con atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y humedad relativa del 95%. Posteriormente se añadió el suero fetal bovino (SFB) sin extraer el medio anterior y en una proporción tal que la concentración final de SFB fuese ajustada al 10%. El cultivo se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$  con atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y 95% de humedad relativa por 3 días.

#### **6.15.2 Obtención de partículas virales adeno-asociadas.**

Tras las 72 horas se adicionó al medio de cultivo 0,02 volúmenes de EDTA 0,5 M pH 8 quedando a una concentración final de 10mM, y se incubó por 3 min a 25 $^{\circ}\text{C}$ . Luego el medio y las células fueron colectadas y centrifugadas a 3000 g por 20 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ . Al sobrenadante de cultivo se le adiciona 0,2 volumen de la solución Poli-etilenglicol (PEG) al 40% (SIGMA, EEUU) en NaCl 2,5M y se dejó reposar en hielo durante 2 horas. Paralelamente al pellet celular fue resuspendido en 20 mL de Buffer de Lisis (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl and 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) y también se incubó en hielo,

por 2 horas. Pasadas las 2 horas el sobrenadante de cultivo fue centrifugado a 3000 g por 30 min a 4 °C, El pellet proveniente de la precipitación con PEG se mezcló con el lisado celular, y esta mezcla se trató con 0,05 volúmenes de Deoxicolato (DOC), y 50U/mL de Benzonasa- nucleasa (Merck, Darmstadt, Alemania) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionaron 5 mL de NaCl 5M y se incubó a 30 min a 50 °C. Finalmente se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación (-80°C/37°C) y la mezcla se centrifugó 30 min a 12000 g, 4°C. El sobrenadante, que es la porción que contenía las partículas virales, se retiró cuidadosamente y se guardó alicuotado en medio DMEM con glicerol al 30% final a -80°C, hasta su uso.

### **6.15.3 Purificación de vectores virales Adeno-asociados mediante cromatografía en matriz de intercambio iónico.**

El pool de vectores AAVs colectados en el paso anterior, se descongeló a 37°C, y se tomó un volumen de muestra (8mL) equivalente a 1/3 de volumen de columna de purificación y se diluyó en 40 mL Buffer de Equilibrio (NH<sub>4</sub>Ac 100 mM, Tris-Cl 20mM, pH 8,5) y se filtró con filtros de membrana de 0,45 um y luego de 0,22 um. Cada muestra ingresó a la columna que contenía la matriz de intercambio iónico Q-Sepharosa, Fast Flow. (GE-Healthcare, EE.UU), previamente equilibrada con 5CV de Buffer de Equilibrio (NH<sub>4</sub>Ac 100 mM, Tris-Cl 20mM, pH 8,5). La muestra circuló a un flujo de 8 ml/min y se recirculó durante 20 min y se pasaron 5 CV de Buffer de equilibrio. Luego se realizó el lavado de columna con 70% de Solución A (NH<sub>4</sub>Ac 180 mM) y 30% de Solución B (NH<sub>4</sub>Ac 1M), en este paso se eliminaron las cápsides vacías de AAV. La elución de la muestra se realizó con NaCl 1M. El proceso se repitió hasta pasar la totalidad del pool de muestra inicial. Todo el proceso se realizó en el equipo cromatógrafo a escala de laboratorio Akta Prime Plus (GE-Healthcare, EE.UU).

#### 6.15.4 Determinación del título viral.

El número de copias del genoma del vector (vg) se determinó mediante q-PCR, utilizando el Kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix, Agilent Technologies (CA, EEUU). El ADN viral fue extraído desde 1µL del stock de partículas purificadas, y se trató con 0,5 Unidades de DNAsa I (Invitrogen, EEUU) por 1 hora a 37°C, esto fue para digerir cualquier ADN contaminante no empaquetado. Posteriormente se adicionan 10 µg de Proteinasa K (Invitrogen, EEUU) para facilitar la disrupción de la cápside viral y liberar el DNA viral. Las qPCR fueron realizadas en el equipo AriaMx (Agilent Technologies, EEUU) con los primers dirigidos contra las regiones de los ITR, las que son secuencias comunes en los plásmidos de transferencia AAVs generados (ver secuencia de primers en Tabla N° 3). Las reacciones de qPCR se realizaron según el protocolo sugerido por el proveedor utilizando 2 ul de la reacción para obtención de ADN y 400 nM de *primers* por reacción de PCR. El programa para la reacción de qPCR fue el siguiente: *Hot Start* 10 min a 95°C, amplificación de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 30 s y 72°C por 30 s. Se generó un curva estándar utilizando cada uno de los plásmidos purificados pAAV-IRF682 y pAAV-IRF682/shARN-OLR-1 generando diluciones seriadas desde  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^3$  copias genómicas, en triplicado. Se utilizó como control positivo de la reacción  $5 \times 10^6$  copias genómicas del pAAV-GFP, y como control negativo la reacción sin templado. Los resultados fueron analizadas con el software AriaMx1.0 (Agilent Technologies, EEUU).

## **6.16 Generación de líneas celulares estables de cáncer próstata, C4-2B, a través de transducción con particular virales adeno-asociadas.**

### **6.16.1 Transducción de células C4-2B con vectores adeno-asociados AAV/IRF682 y AAV/IRF682/shARN-OLR-1.**

Las células de cáncer de próstata C4-2B se cultivaron en placas de 96 pocillos hasta una confluencia celular del 60%, se incubaron con 20  $\mu$ L de los vectores AAV/IRF682 o AAV/IRF682/shARN-OLR-1, durante 12 horas en medio RPMI sin suero. Luego de la incubación se retiró el medio de cultivo y se agregó RPMI con de suero fetal bovino al 10% hasta alcanzar confluencia celular en los días posteriores.

### **6.16.2 Selección de células positivamente transformadas mediante Citometría de Flujo con *cell Sorting*.**

En este trabajo las células C42B transducidas fueron seleccionadas mediante citometría acoplado a *cell sorting*, en base a la fluorescencia de la proteína trazadora IRFP-682, Para cada ensayo las células fueron tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas en PBS (Corning, EEUU), a una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  células/mL. Cada suspensión celular fue dispuesta en un tubo de citómetro (BD Biosciences, CA, EEUU). Las muestras fueron analizadas y seleccionadas en el equipo Citómetro de Flujo Cell Sorter BD FACSAria III equipado con el software de adquisición y análisis FACSDiva (BD Biosciences, CA, EEUU) en el Centro de Microscopía Avanzada, CMA. BíoBío, equipado con láser de 633 nm, con filtro A 780/60, B 730/45 y C 660/20.

En este estudio se seleccionaron células en función de la fluorescencia infrarroja, asociado a la expresión de la proteína IRFP-682, para ello se utilizó el filtro 660/20. Las células positivas para este parámetro, fueron luego sorteadas en modo

"purity" utilizando el software Diva. La adquisición de datos se realizó considerando 10.000 eventos por muestra. (En este estudio se seleccionaron células en función de la fluorescencia infrarroja capturada por el canal de lectura APC). Una vez colectadas las sub-poblaciones celulares de interés, se sembraron independientemente en placas de cultivo celular de 60 mm de diámetro y cultivadas en medio RPMI-10%FBS, hasta alcanzar la confluencia suficiente para realizar análisis de expresión del receptor LOX-1 y posteriormente hacer crio-preservación de las nuevas líneas celulares generadas.

### **6.16.3 Análisis de expresión del receptor LOX-1 mediante western blot en líneas celulares de cáncer de próstata C4-2B**

La expresión del receptor LOX-1 fue determinada por western blot en las líneas celulares de cáncer de próstata C4-2B nativas, y las generadas en este tesis: C4-2B/IRF682 y C42B/IRF682/shARN-*OLR-1*. Las células fueron crecidas según lo descrito en el epígrafe cultivos celulares. Las proteínas totales de cada una de las líneas celulares ensayadas (30 µg) fueron sembradas y resueltas por SDS-PAGE al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) por 30 minutos a voltaje constante de 25 volt y un amperaje máximo de 0,3 amperes utilizando el equipo de transferencia *Trans-Blot Turbo, Transfer System* (Bio-Rad, EEUU), para luego ser bloqueadas con buffer de Bloqueo TBS 50 mM pH 7,5 leche descremada al 5% (p/v) por dos horas. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal echo en ratón ox-LDL R-1/ (E-19) (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) en un título de 1/1000 por 4 horas. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces por 5 minutos con buffer TBS 50 mM pH 7,5 más Tween-20 0,05%, luego se incubada en buffer de bloqueo con el anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón hecho en burro conjugado a Alexa Fluor 790 en un título de 1/5000 (Jackson, EEUU). Como

control de carga se utilizó la inmunodetección de  $\beta$ -actina, con un anticuerpo IgG anti-beta actina (C4) hecho en ratón (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 680 (Jackson, EEUU). Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR (Texas, EEUU).



## **6.17 Análisis del efecto de LDLox en la expresión a nivel de proteína de marcadores pro-angiogénicos, marcadores de transición epitelio mesenquimal y LOX-1 en las líneas celulares de cáncer de próstata: C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682/shARN-OLR-1.**

### **6.17.1 Tratamientos de células de cáncer de próstata con LDLox.**

Se cultivaron 500.000 células de cáncer de próstata C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682/shARN-OLR-1, en placas de 12 pocillos (Corning, EEUU) hasta una confluencia aproximada del 80%, en las condiciones de cultivo descritas anteriormente en el epígrafe cultivos celulares. Las células de cáncer de próstata fueron tratadas con por 48 horas con 500  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI con SFB al 2,5 % el cual contenía 100  $\mu$ g/mL de LDLox. Como control se utilizó 500  $\mu$ L de medio de cultivo 2,5% con 50 $\mu$ L de PBS sin LDLox.

### **6.17.2 Extracción de proteínas.**

Las células tratadas con y sin LDLox fueron lavadas con PBS por 5 minutos y fueron incubadas con 100  $\mu$ L de buffer RIPA (ThermoFisher Scientific, EEUU) más *cocktail* de inhibidores de proteasas 1X (ThermoFisher Scientific, EEUU) durante 30 minutos a 4°C. El lisado celular fue resuspendido por pipeteos sucesivos y almacenado en tubos de 1,5 mL a -80°C. Las proteínas totales fueron cuantificadas en placas de 96 pocillos utilizando el método de BCA con el reactivo Pierce™ Protein Assay Kit, (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

### 6.17.3 SDS-PAGE y Western Blot.

Se sembraron 30 µg de proteínas totales de las células tratadas con y sin LDLox fueron resueltas por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% a un voltaje constante de 120 volt. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF *immobilon FL* 0,45 µm, utilizando el equipo de transferencia semi-seca *Trans-Blot Turbo, Transfer System* (Bio-Rad, EEUU), por 30 minutos a un voltaje constante de 25 Volt y un amperaje máximo de 0,3 amperes. Las membranas fueron bloqueadas con buffer de bloqueo TBS 50 mM pH 7,5 leche descremada al 5% (p/v) por dos horas. Las membranas fueron incubada en buffer de bloqueo-Tween-20 0.05% v/v con un anticuerpo primario específico para cada uno de los marcadores de angiogénesis, transición epitelio mesenquimal, anticuerpo anti-LOX-1 (La descripción específica y títulos utilizados para cada uno de los anticuerpos utilizados durante esta tesis se describen en la Tabla 1. Posteriormente la membrana fue lavada 3 veces por 5 minutos con buffer TBS 50 mM pH 7,5 -Tween-20 al 0,05% v/v, la membrana fue incubada en buffer de bloqueo con el anticuerpo secundario apropiado para cada uno de los marcadores analizados (Tabla 2). Las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con buffer TBS 50 mM pH 7,5 -Tween-20 al 0,05% v/v y reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja ODISSEY CLX, LI-COR (Texas, EEUU).



**6.18 Análisis de la expresión relativa a nivel de mRNA de marcadores de angiogénesis, transición epitelio mesenquimal y LOX-1 en las líneas celulares de cáncer de próstata: C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682/shARN-OLR-1 tratadas con LDLox.**

**6.18.1 Extracción de ARN total.**

La extracción de ARN se realizó utilizando el método de Trizol® (Ambion, Life technologies). Para ello, aproximadamente 800.000 células fueron tripsinizadas, traspasadas a un tubo cónico de 1,5 mL y centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante se descartó y se adicionó el volumen de Trizol® recomendado por el fabricante, se homogenizó durante 5 min a 25 °C, luego se agregó cloroformo (sin alcohol isopropílico), se agitó y se dejó incubando la muestra durante 3 min a 25°C. Posteriormente el tubo se centrifugó a 12000g durante 15 min a 4°C, para extraer el ARN, se removió exclusivamente la fase superior (acuosa) y se traspasó a un tubo de propileno nuevo. Para precipitar el ARN se adicionó isopropanol al 100%, se incubó durante 10 min a 25°C, y se centrifugó a 12000g por 10 min a 4°C. Luego, el ARN se lavó con etanol al 75%, se centrifugó a 7500g por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar. Finalmente el pellet de ARN se resuspendió en agua de biología molecular. La integridad del ARN extraído se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en él se identificaron las sub-unidades ribosomales 18S y 28S. La cuantificación del ARN se realizó por espectrofotometría a una  $\lambda$  260/280 nm en equipo SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Alemania), los ARN fueron diluidos a una concentración de 50 ng/ $\mu$ L y almacenados a -80°C hasta su utilización.

### **6.18.2 Análisis de expresión relativa de mARN mediante PCR en tiempo Real de 1 paso.**

Para el análisis de expresión relativa se utilizó el Kit de PCR en tiempo real de un paso Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix 1-step (Agilent Technologies, EEUU). Las reacciones de PCR se realizaron según el protocolo sugerido por el proveedor utilizando 100 ng de RNA y 400 nM de *primers* por reacción de PCR. Todos los *primers*, ciclos, temperaturas y tiempos de cada uno de segmentos de la reacciones de retro-transcripción, PCR y *Melting* están indicados en la tabla 3. Las PCR fueron realizadas en el equipo AriaMx y analizadas con el software AriaMx1.0 (Agilent Technologies, EEUU) con el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando como normalizador  $\beta$ -actina o 18S.

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

Las células de cáncer de próstata C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682/shARN-OLR-1 fueron cultivadas hasta una confluencia del 80%, posteriormente las células fueron tripsinizadas y cuantificadas en cámara de Neubauer.  $3 \times 10^6$  células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de matrigel 50% v/v en medio de cultivo RPMI (B&D, EEUU) y mantenidas en hielo hasta ser inoculadas en los ratones. Los ratones *nude* fueron anestesiados con isofluorano y luego se les inyectaron 200  $\mu$ L de una suspensión de matrigel/RPMI con  $3 \times 10^6$  de células de cáncer de próstata C42B/IRF682 (control) en la región dorsal inferior derecha y  $3 \times 10^6$  de células de cáncer de próstata C42B/IRF682/shARN-OLR-1 en la región dorsal inferior izquierda del mismo ratón. Los animales fueron mantenidos durante 10 semanas para analizar posteriormente el tamaño, masa y volumen del tumoral.

## 6.20 Análisis de datos

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



**Tabla 1: Anticuerpos primarios y títulos utilizados para análisis de expresión mediante *western blot*.** (Fuente: Elaboración propia)

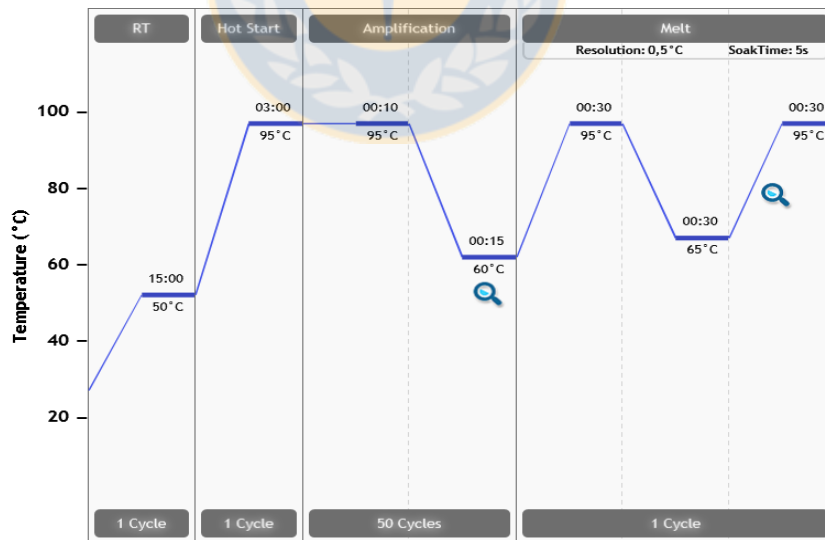
<b>Anticuerpos Primarios</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Título</b>
<b>Anti-<math>\beta</math>-actina (AC-15)</b>	Santa Cruz	sc-816	ratón	monoclonal 1/5000
<b>Anti-OxLDL R-1 (E-19)</b>	Santa Cruz	sc-11650	cabra	policlonal 1/1000
<b>Anti-LOX-1/OLR1</b>	R & D	AF1798-sp	cabra	policlonal 1/1000
<b>Anti-VEGF</b>	Roche	Ab00715	humano	monoclonal 1/5000
<b>Anti-MMP-2( H76)</b>	Santa Cruz	sc-10736	conejo	policlonal 1/1000
<b>Anti-MMP9 (M17)</b>	Santa Cruz	sc-6841	cabra	policlonal 1/1000
<b>Anti- E-cadherina (G-10)</b>	Santa Cruz	sc-8426	ratón	monoclonal 1/1000
<b>Anti-plakoglobina (H-80)</b>	Santa Cruz	sc-7900	conejo	policlonal 1/1000
<b>Anti- Vimentina (C-20)</b>	Santa Cruz	sc-7557	cabra	policlonal 1/1000

**Tabla 2: Anticuerpos secundarios y títulos utilizados para análisis de expresión mediante *western blot*.** (Fuente: Elaboración propia)

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

**Tabla 3: Secuencia de los partidores utilizados para los análisis de expresión mediante PCR en tiempo real, seguido de esquema de perfil térmico para PCR en tiempo real de un paso.**  
(Fuente: Elaboración propia)

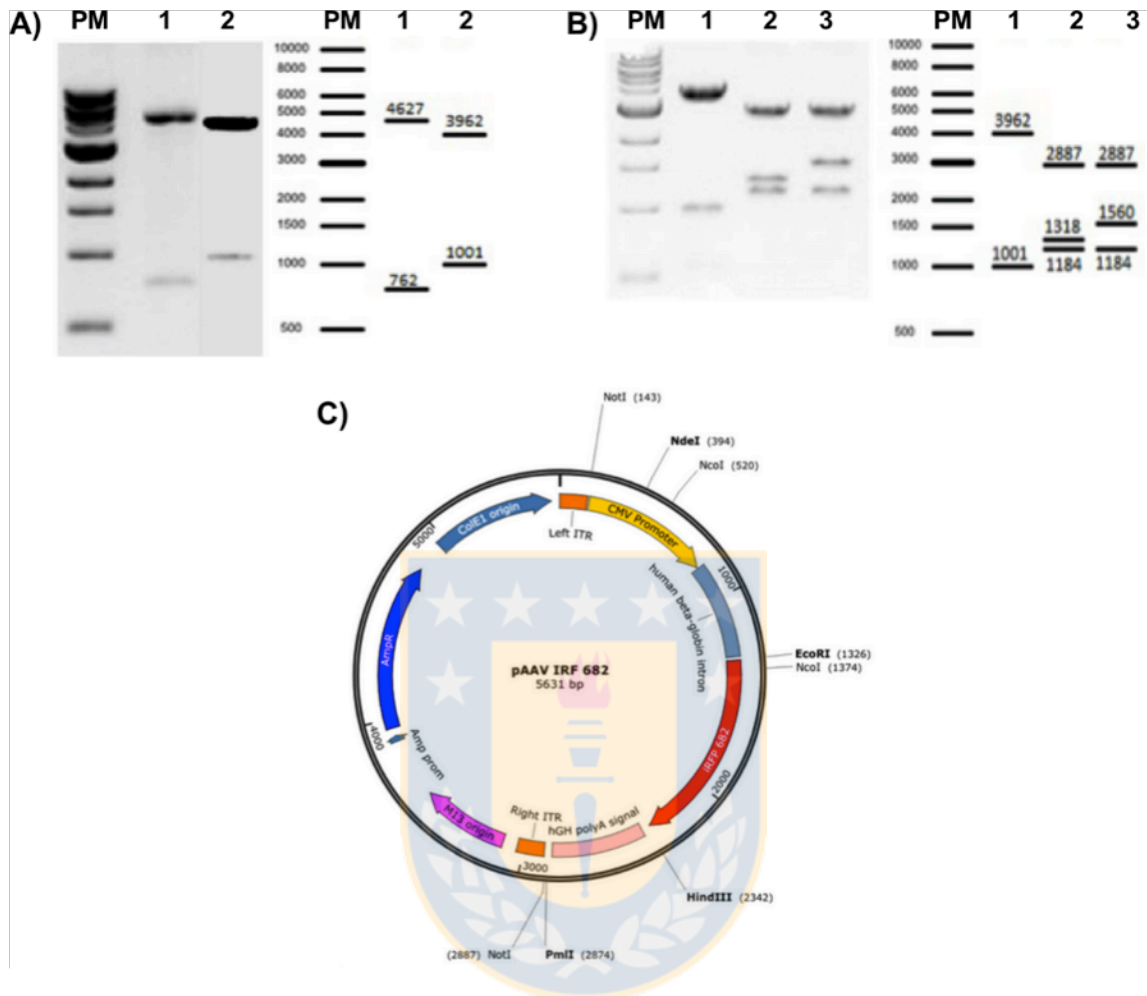
Gen	Secuencia	TM °C
LOX-1 (forward)	AGATCCAGACTGTGAAGGACCAGC	63
LOX-1 (reverse)	CAGGCACCACCATGGAGAGTAAAG	62
E-cadherina (forward)	CCTGGGACTCCACCTACAGA	57,9
E-cadherina (reverse)	TGG ATT CCA GAA ACG GAG GC	57,4
N-cadherina (forward)	CAGTATCCGGTCCGATCTGC	57,3
N-cadherina (reverse)	CAT ATG GTG GAG CTG TGG GG	57,8
Vimentina (forward)	CCGGGAGAAATTGCAGGAGGAG	59,1
Vimentina (reverse)	AGG TCA AGA CGT GCC AGA GAC	59,8
Y-catenina (forward)	GACGGGCGCAAAGATGGTG	59,5
Y-catenina (reverse)	TGC TCT CCT GGT TGC CGT AG	59,4
MMP-2 (forward)	GCCTGAGCTCCCGAAAAGA	59,7
MMP-2 (reverse)	GGG TGC TGG CTG AGT AGA TCC	59,6
MMP-9 (forward)	TGCCTTTGGACACGCACGA	60,1
MMP-9 (reverse)	TGG TTC AAC TCA CTC CGG GAA C	59,2
VEGF (forward)	CTGCTCTACCTCCACCATGC	57,7
VEGF (reverse)	AGC TGC GCT GAT AGA CAT CC	57,1
18S (forward)	TAG CCT TTG CCA TCA CTG CCA	59,3
18S (reverse)	GAG TTC TCC CGC CCT CTT GG	60
AAV2-ITR (forward)	GGA ACC CCT AGT GAT GGA GTT	56,1
AAV2-ITR (reverse)	CGG CCT CAG TGA GCG A	57,7



## 7 Resultados

### 7.1 Construcción del plásmido de transferencia adeno-asociado que expresa la proteína fluorescente infrarroja, pAAV/IRF682.

Para la construcción del plásmido pAAV/IRF682 se utilizó el vector de empaquetamiento pAAV/GFP, el cual fue digerido con endonucleasas *EcoRI* y *HinclI* para eliminar la secuencia que codificaba para la proteína GFP y así quedarnos con el la secuencia del plásmido AAV que tiene un tamaño de 4627 pb (Fig. 10-A). En paralelo se digirió el plásmido comercial pIRF682-N1 (Addgene plasmid # 45459) con las enzimas *EcoRI* y *NotI*, y se aisló el fragmento de 1001 pb que codifica para la proteína IRFP682. El fragmento con la secuencia codificante para la proteína IRF 682 se incorporó al vector pAAV obtenido inicialmente, generándose como resultado un vector plasmidial de transferencia adeno-asociado de 5631pb, denominado pAAV/IRF682. Este vector recombinante se identificó mediante ensayos de restricción con enzimas *EcoRI* y *NotI*, donde el plásmido correctamente ligado mostró el patrón de bandas teórico de 2887pb, 1560pb y 1184pb (Fig. 10-B).

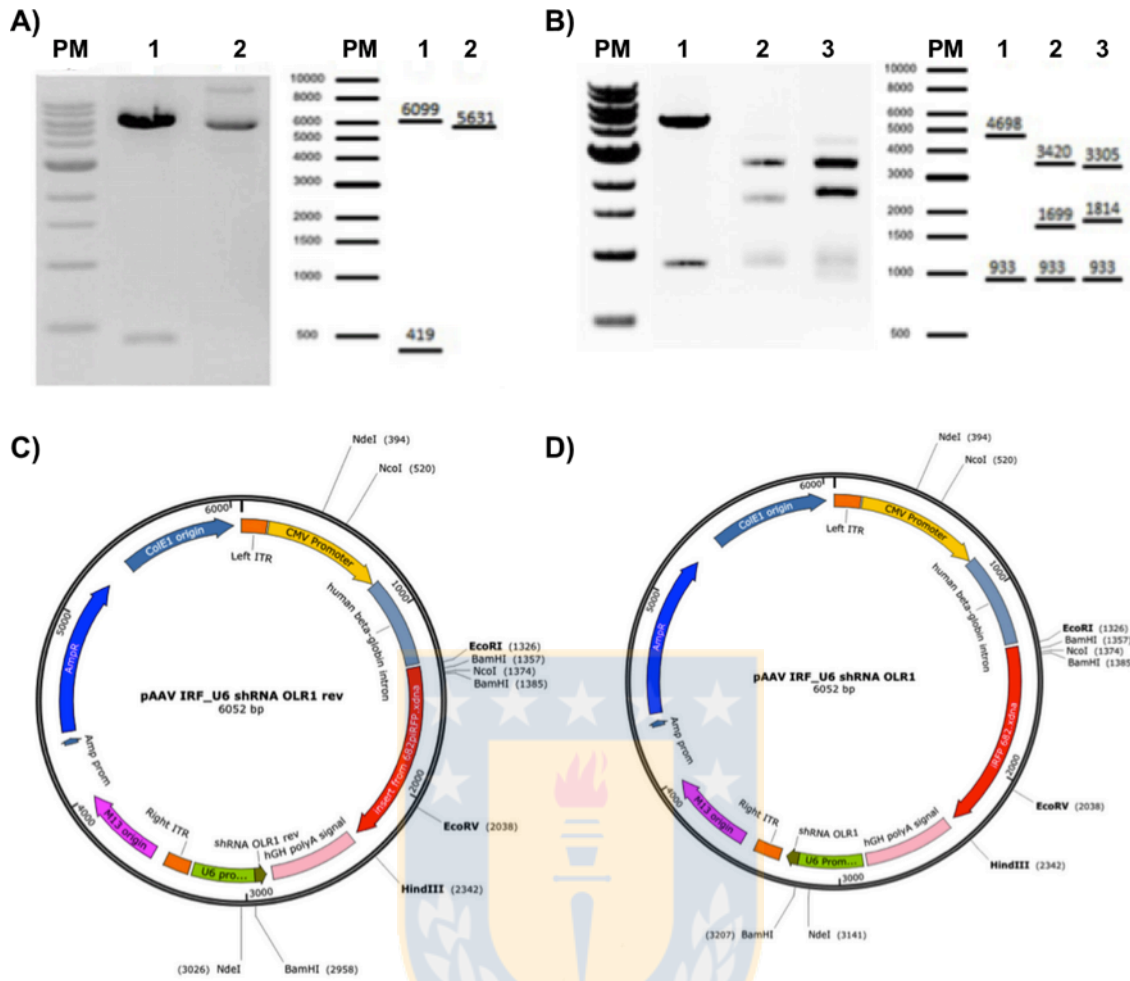


**Figura 10: Generación del plásmido pAAV/IRF682.** **A)** análisis de restricción para obtener el fragmento de ADN que codifica para la proteína fluorescente infrarroja IRFP 682 necesaria para sub-clonarla en el vector pAAV. Carril 1: vector pAAV/GFP digerido con *EcoRI-HinCII*, carril 2: vector comercial pIRF682 digerido con *EcoRI-NotI*. **B)** Análisis de restricción para corroborar el correcto clonamiento de la secuencia de ADN que codifica para IRF682 en vector pAAV mediante cortes con enzimas *EcoRI-NotI*. Carril 1: pIRF682, carril 2: pAAV/GFP, carril 3: plásmido generado pAAV/IRF 682. **C)** Esquema virtual del plásmido pAAV/IRF682 (Fuente: Elaboración propia).

## **7.2 Construcción de un plásmido de transferencia adeno-asociado que co-expresa la proteína fluorescente infrarroja y el shARN contra el gen *OLR-1*, pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1*.**

Para la construcción del plásmido pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* se utilizó el plásmido pLU6W/shARN-*OLR-1* (generado en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos), el cual fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *EcoRV* para aislar el fragmento de 419 pb correspondiente al shARN contra el mensajero del gen *OLR-1* bajo la secuencia del promotor U6. El plásmido pAAV/IRF682 generado fue linealizado con la enzima *PmlI* (Fig. 11-A), y se subclonó la banda U6/shARN, obteniéndose como resultado un vector plasmidial de transferencia adeno-asociado de 6052 pb, denominado pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1*. El vector recombinante se identificó mediante ensayos de restricción con las enzimas *EcoRI* y *NdeI*, y se encontraron 2 posibles combinaciones correctas, debido a que la banda U6/shARN se ligó con los 2 extremos romos, el plásmido ligado en sentido 5'-3' presentó un patrón de bandas esperado de 3305 pb, 1814 pb y 933 pb. Por su parte el plásmido ligado en sentido reverso, 3'-5' (pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* rev), mostró un patrón de bandas esperado de 3420 pb, 1699 pb y 933 pb (Fig. 11 B, C y D).

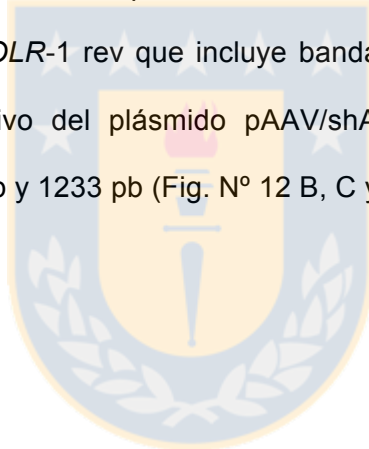


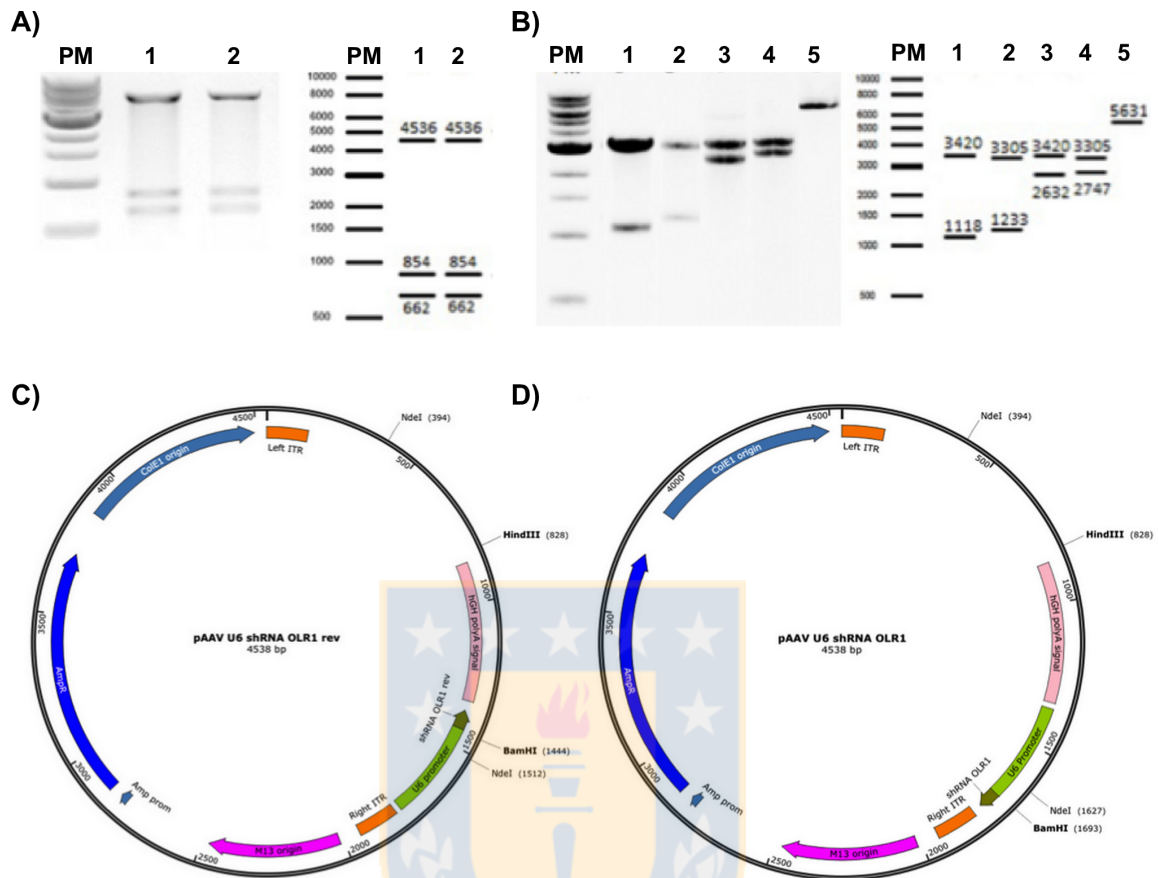


**Figura 11: Generación del plásmido pAAV/IRF682/shARN-OLR-1.** **A)** Análisis de restricción para obtener el fragmento de ADN que codifica para un fragmento *short hairpin* ARN dirigido contra el mensajero del gen *OLR-1* en conjunto con el promotor U6. Carril 1: pL/U6 shARN *OLR-1* digerido con *EcoRI-EcoRV* para extraer el fragmento U6 shARN *OLR-1*, carril 2: pAAV/IRF 682 linealizado con la enzima *PmlI*. **B)** Análisis del sub-clonamiento del fragmento U6 shARN-*OLR-1* en el vector plasmidial pAAV/IRF 682 mediante cortes con enzimas *EcoRI* y *NdeI*. Carril 1: vector pAAV/IRF 682, carril 2: vector pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* rev, en el que el fragmento U6 shARN se incorporó en forma inversa, carril 3: pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1*. **C)** Esquema virtual del plásmido pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* rev. **D)** Esquema virtual del plásmido pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* (Fuente: Elaboración propia).

### **7.3 Construcción de un plásmido de transferencia adeno-asociado que expresa el shARN contra el gen *OLR-1*, pAAV/shARN-*OLR-1*.**

Para la generación del plásmido pAAV/shARN-*OLR-1* se utilizó el plásmido pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* y pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* rev, de los cuales se extrajo el fragmento que incluía las secuencias del promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (pCMV) y la secuencia que codificaba para la proteína trazadora iRF682 con las enzimas *NcoI*- *EcoRV*, en esta digestión se conserva la secuencia del vector correspondiente a la banda de 4538 pb (Fig. 12-A). Finalmente se corrobora ligación de los plásmidos generados, mediante ensayo de restricción con la endonucleasa *NdeI*, y se obtuvieron 2 patrones de bandas, el primero correspondiente al plásmido pAAV/UshARN-*OLR-1* rev que incluye bandas de 3420 pb y 1118 pb y el segundo patrón representativo del plásmido pAAV/shARN-*OLR-1*, que muestra un patrón de bandas de 3305 pb y 1233 pb (Fig. N° 12 B, C y D).

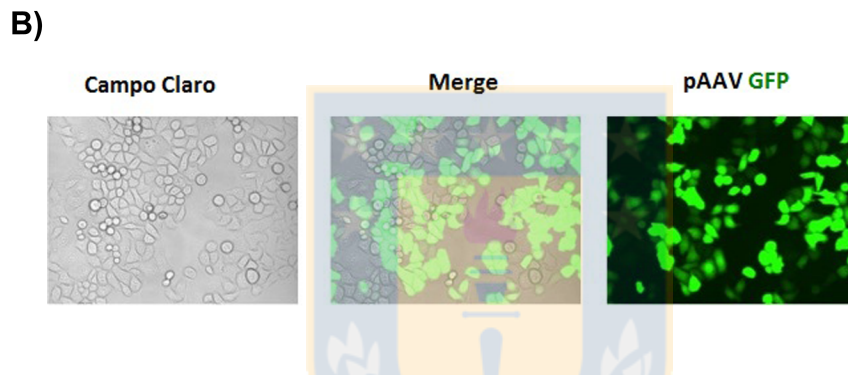
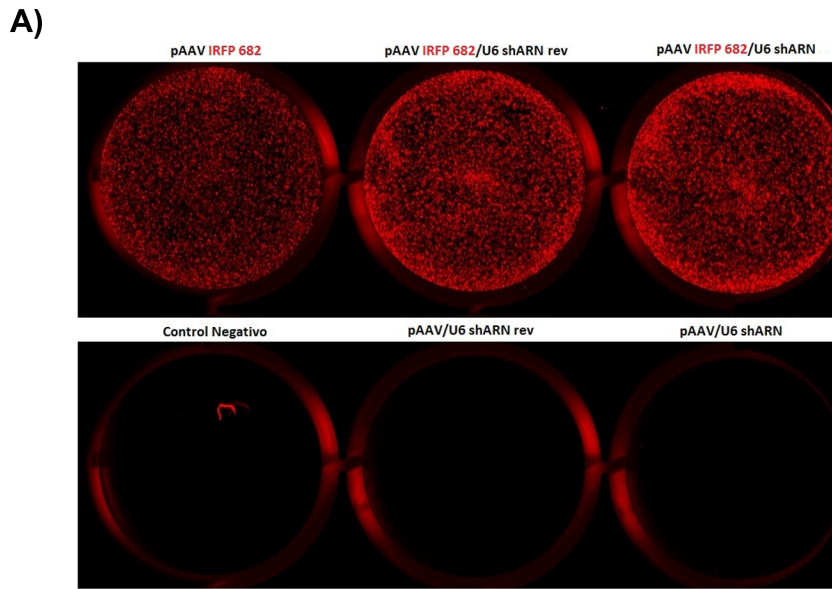




**Figura 12: Generación del plásmido pAAV/shARN-OLR-1.** A) Ensayo de restricción de los plásmidos pAAV/IRF682/shARN-OLR-1 digeridos con enzimas *NcoI*-*EcoRV* para eliminar la secuencia IRF682. Carril 1: vector pAAV/IRF682/shARN-OLR-1rev, carril 2: vector pAAV/IRF682/shARN-OLR-1. B) Análisis de restricción de plásmidos generados, con enzima *NdeI*. Carril 1: pAAV/U6 shARN rev, carril 2: pAAV/U6 shARN, carril 3: pAAV/IRF682/shARN rev, carril 4: pAAV/IRF682/shARN, carril 5: pAAV/IRF682. C) Esquema virtual del plásmido pAAV/shARN-OLR-1 rev. D) Esquema virtual del plásmido pAAV/shARN-OLR-1 (Fuente: Elaboración propia).

#### **7.4 Análisis funcional de los vectores plasmidiales pAAV/IRF682, pAAV/IRF682/shARN-OLR-1 y pAAV/shARN-OLR-1.**

Cada uno de los plásmidos generados fueron transfectados en las células HeLa y como control de transfección se incluyó el plásmido pLGW (el cual codifica para la proteína fluorescente verde, GFP). Se visualizó un elevado nivel de transfección, evaluada cualitativamente por microscopia de fluorescencia basado en la expresión de GFP en células HeLa (Fig. 13-B). Posteriormente se evaluó la expresión de la proteína fluorescente infrarroja mediante escaneo de la placa de cultivo celular en el equipo Odissey CLX (Li-COR, EEUU) utilizando el canal de emisión de 700 nm, y se observó que los plásmidos codifican la proteína IRF682 (pAAV/IRF682, pAAV/IRF682/shARN-OLR-1 y pAAV/IRF682/shARN-OLR-1 rev) expresan la proteína marcadora, versus el control sin transfección. Además las células transfectadas con los plásmidos pAAV/shARN-OLR-1 y pAAV/shARN-OLR-1 rev, que no contienen la secuencia codificante de la proteína IRF682, se observa que no emiten fluorescencia en el equipo (Fig. 13-A).

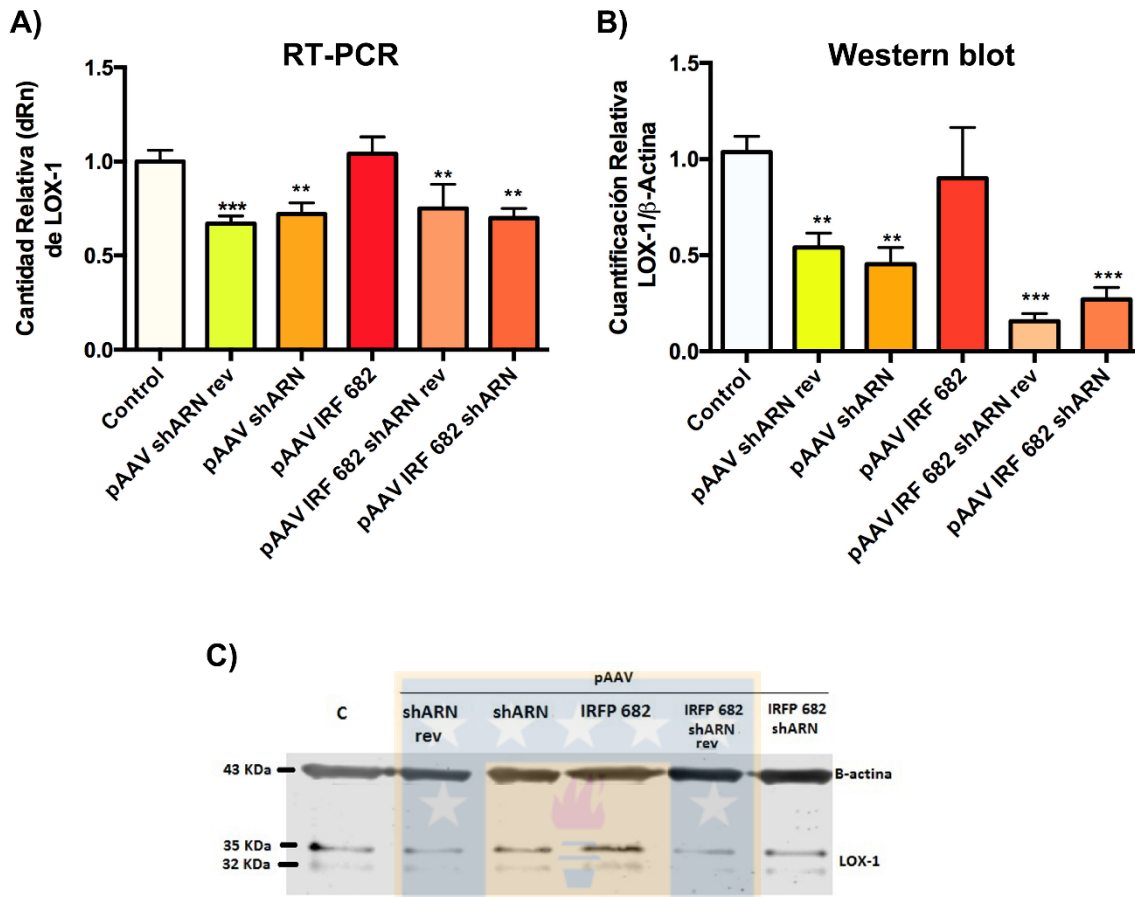


**Figura 13: Ensayo funcional de la expresión de la proteína fluorescente infrarroja.**

**A)** Células Hela transfectadas con los plásmidos pAAV/IRF682, pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* y pAAV/shARN-*OLR-1*. La correcta expresión de la proteína fluorescente infrarroja fue detectada a las 48 hrs. post transfección a través del equipo de detección infrarroja Odyssey CLX (Li-COR, EEUU) utilizando el canal de emisión de 700 nm. **B)** Microfotografías de células Hela transfectadas con plásmido pAAV/GFP como control de transfección. Las imágenes fueron obtenidas por el sistema de microscopía FLoid® Cell Imaging Station (Invitrogen®) con una magnificación de 20X (Fuente: Elaboración propia).

La funcionalidad en la reducción de la expresión del receptor LOX-1, para cada uno de los vectores generados, se evaluó mediante PCR en tiempo real y *western-blot*. Se demostró que los 4 plásmidos que expresan el shARN contra el gen *OLR-1* disminuyen en un 40% aproximadamente, la expresión del ARN mensajero de LOX-1, respecto a los niveles de expresión del receptor en la línea celular HeLa sin transfectar y las células HeLa transfectadas con el plásmido pAAV/IRF682, usadas como control (Fig. 14-A). Además, este resultado fue complementado con un análisis de expresión del receptor LOX-1 a nivel de proteína mediante *western- blot* , en el cual se observó que los plásmidos pAAV/shARN-*OLR-1* y pAAV/shARN-*OLR-1* rev disminuyen en un 50% la expresión de LOX-1, respecto a la expresión basal de las células HeLa sin transfectar y el control de transfección pAAV/IRF682. Además, los plásmidos pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* y pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* rev disminuyen en un 30% la expresión de LOX-1 respecto a la expresión basal de las células HeLa sin transfectar y el control de transfección pAAV/IRF682 (Fig. 15 B y C).

En conjunto, los resultados demuestran que los vectores de expresión pAAV/IRF682-shARN-*OLR-1* y pAAV/shARN-*OLR-1* son funcionales, induciendo una disminución de la expresión del receptor LOX-1. Para continuar con los estudios de esta tesis, se utilizó el plásmido pAAV/IRF682/shARN-*OLR-1* para generar partículas recombinantes de virus adeno-asociadas, ya que tiene como ventaja la co-expresión funcional de la proteína trazadora IRF682 y como control de transducción se generaran partículas virales adeno-asociadas con el plásmido pAAV/IRF682.



**Figura 14: Análisis de expresión del receptor LOX-1 en células HeLa transfectadas con los plásmidos pAAV/IRF682, pAAV/IRF682/shARN-OLR-1, pAAV/shARN-OLR-1.** **A)** Gráfica de niveles de expresión relativa de mRNA de LOX-1 a las 24 hrs post transfección. La gráfica representa las media  $\pm$  s.d. de tres experimentos independientes en triplicado. Análisis de varianza con factor, con post test de Dunnett ( $***p \leq 0.001$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $*p \leq 0.05$ ). **B)** La gráfica de las medias de las densidades de banda de LOX-1 normalizada por  $\beta$ -actina  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor con post test de Dunnett ( $***p \leq 0.001$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $*p \leq 0.05$ ). **C)** Análisis de la expresión de LOX-1 a nivel de proteína, mediante *Western blot* de lisados totales de células HELA transfectadas con los plásmidos generados. Se utilizó como anticuerpo primario IgG Anti-hLOX-1 hecho en cabra (R&D) en título 1/3000 y el anticuerpo anti- $\beta$ actina hecho en ratón (Santa Cruz) en título 1/5000 y los anticuerpos secundarios anti IgG de cabra conjugado con Alexa Fluor 790 y anti- IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 680 (Jackson Laboratory) ambos en título 1/5000. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja Odyssey CLX (Li-COR, EEUU) (Fuente: Elaboración propia).

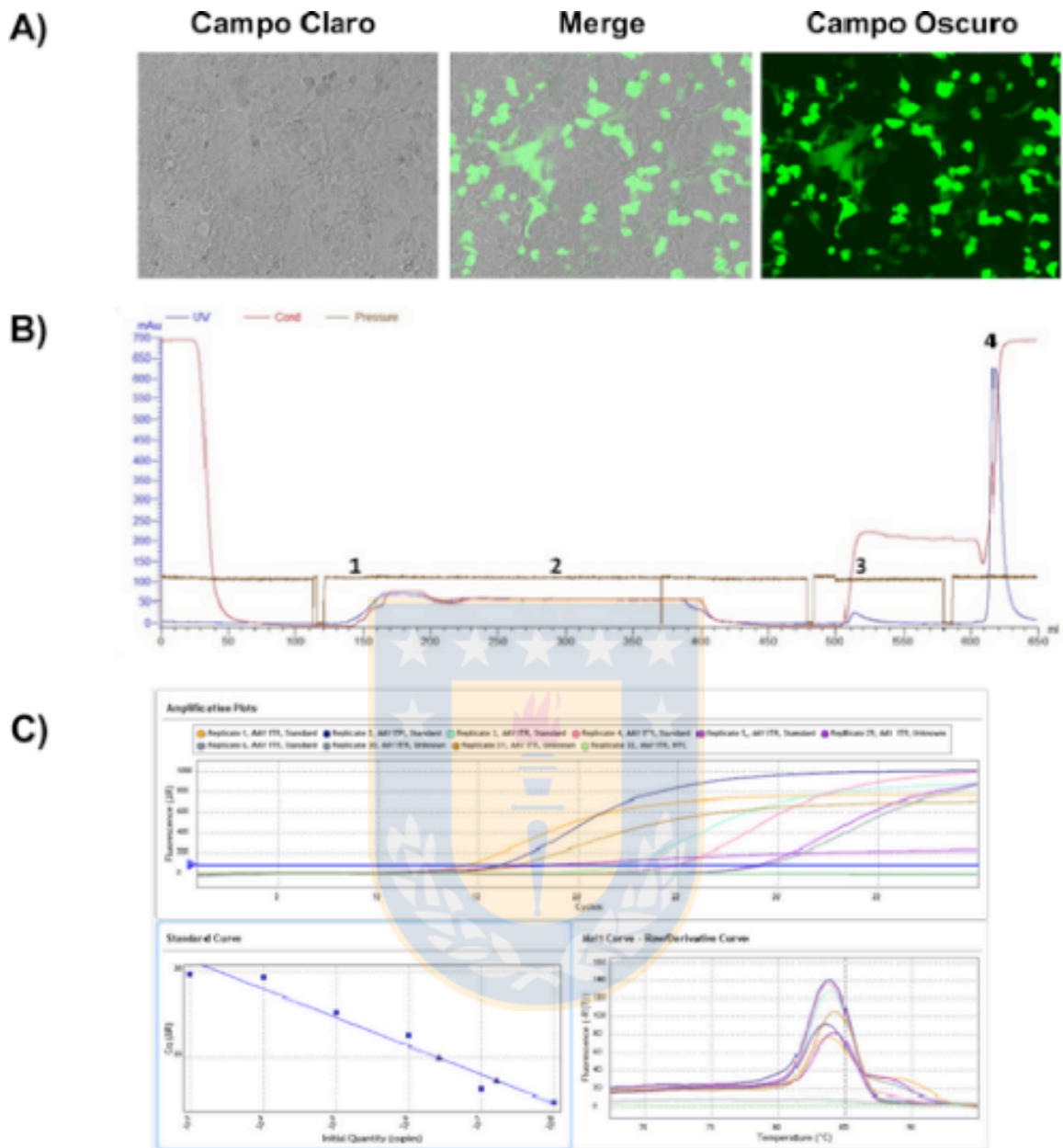
### **7.5 Generación de vectores virales adeno-asociados recombinantes AAV/IRF682 y AAV/IRF682/shARN-OLR-1.**

El vector pAAV/IRF682/shARN-OLR-1 fue co-transfectado junto con los plásmidos ayudantes pDJ y pHelper en la línea celular HEK 293-AAV para generar las partículas virales recombinantes AAV/IRF682/shARN-OLR-1. El mismo procedimiento se realizó con el plásmido pAAV/IRF682, como control de transfección se utilizó el plásmido pAAV/GFP. Después de 72 horas se estimó cualitativamente que a un 60% de las células transfectadas con el plásmido pAAV/GFP expresaban GFP (Fig. 15-A).

A las 72 horas post-transfección se hace la cosecha de las partículas virales obtenidas para cada transgen de interés a partir del sobrenadante de cultivo y se incluyó el lisado celular, para aumentar el título viral. Como este último paso, paralelamente aumenta los contaminantes en las muestras, se añadió un paso extra de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando la matriz Q-sepharose..En la elución se obtuvieron 2 fracciones: una fracción minoritaria en la que se obtuvieron las partículas virales vacías y en la fracción mayoritaria se eluyen las partículas virales recombinantes que contienen en transgén de interés (Fig. 15-B)

Las muestras de AAV/IRF682 y AAV/IRF682/shARN-OLR-1 purificadas y concentradas se titularon mediante PCR cuantitativo (Q-PCR) (Fig. 15-C), y se obtuvieron títulos de  $1,24 \times 10^9$  pv/mL de partículas AAV/IRF682 y  $1,2 \times 10^{10}$  pv/mL de viriones AAV/IRF682/shARN-OLR-1.

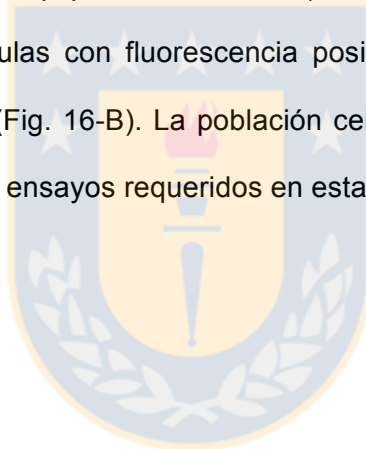


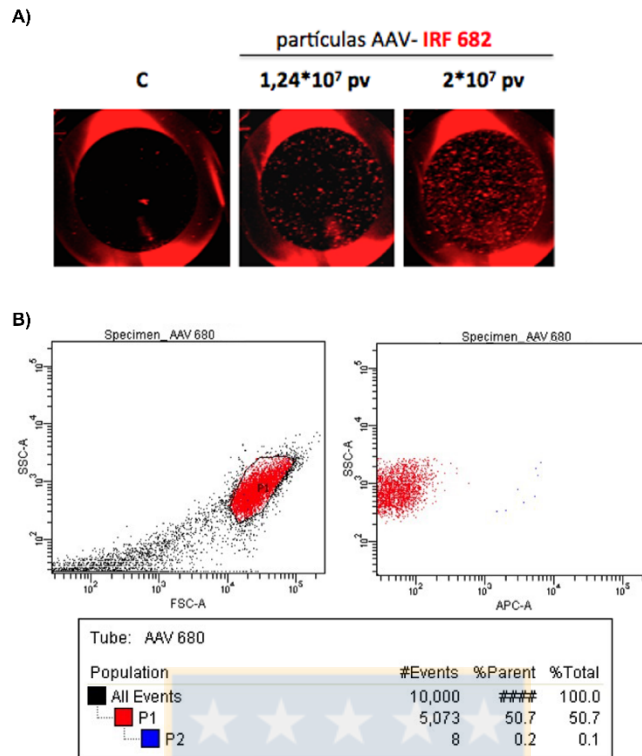


**Figura 15: Obtención y purificación de vectores recombinantes AAV. A)** Visualización de la transfección con el plásmido pAAV/GFP (72 hrs post-transfección), las imágenes fueron obtenidas por el sistema de microscopía FLoid® Cell Imaging Station (Invitrogen®) con una magnificación de 20X. **B)** Cromatograma modelo de la purificación de partículas virales deficientes en replicación AAV en matriz de intercambio aniónico, Q-sepharose. 1: inyección de la muestra con partículas virales AAV. 2: recirculación. 3: Lavado de la matriz con 70% de solución A (NH<sub>4</sub>Ac 180 mM) y 30% de Solución B (NH<sub>4</sub>Ac 1M) elución de las partículas virales vacías. 4: Elución de la muestra con NaCl 1M, obtención de partículas virales que contienen en transgén de interés. **C)** Parámetros de la titulación de las partículas AAVs obtenidas, mediante Q-PCR: (imagen superior) curvas de amplificación de las muestras, (imagen inferior izquierda) curva de Calibración: estándar (n) 10<sup>3</sup> -10<sup>8</sup> copias, muestras (Δ), (imagen inferior derecha) curvas de disociación de las muestras y el estándar (Fuente: Elaboración propia).

## **7.6 Generación de líneas celulares estables de cáncer de próstata C4-2B que expresan establemente la proteína trazadora IRF682.**

Para el desarrollo de los siguientes objetivos de esta tesis era necesario generar una línea celular como control de transducción. Para esto la línea celular C4-2B fue transducida con  $1 \times 10^7$  y  $2 \times 10^7$  partículas virales de AAV IRF682, estos viriones incorporan la secuencia codificante para la proteína trazadora IRF682. La transducción celular efectiva se detectó mediante escáner de la placa de cultivo en el equipo de detección de fluorescencia infrarroja, y se observó fluorescencia en los pocillos transducidos (Fig. 16-A). Las células fueron seleccionadas mediante citometría acoplada a *cell sorter* en el equipo FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, EE.UU), la población de células con fluorescencia positiva correspondía al 0,2% del total de eventos detectados (Fig. 16-B). La población celular seleccionada se mantuvo en cultivo para desarrollar los ensayos requeridos en esta tesis.



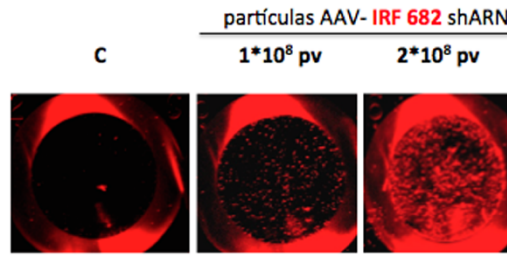


**Figura 16: Transducción de células C4-2B con el vector Adeno-asociado IRF682.** A) Las células C4-2B fueron transducidas con el vector AAV/IRF682 generado. La expresión de la proteína fluorescente infrarroja fue identificada a las 48 hrs post transducción en el equipo de detección infrarroja Odissey CLX (Li-COR, EEUU) utilizando el canal de emisión de 700 nm. B) Representación en gráfico de puntos, al lado izquierdo se muestra el gráfico de *Forward scatter* (FSC) versus el *Side scatter* (SSC) correspondientes al tamaño y a la complejidad celular, respectivamente, para definir la población celular. En el panel de la derecha se representa el gráfico SSC versus Fluorescencia del canal APC que muestra la población de células C4-2B transducidas con el vector AAV/IRF682, y seleccionada a través de citometría de flujo con *cell sorter* en el equipo FACSaria III (Becton, Dickinson and Company, EE.UU) (Fuente: Elaboración propia).

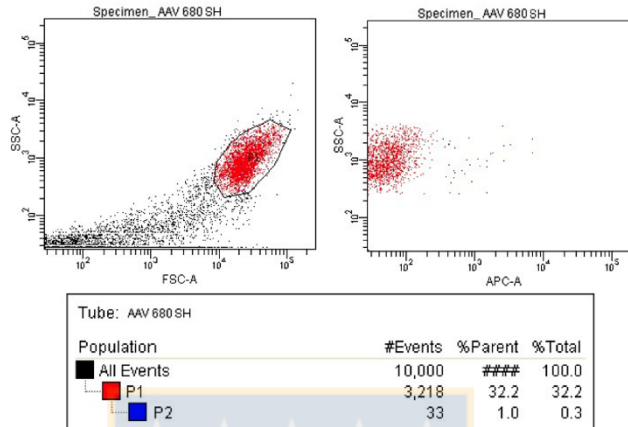
### **7.7 Generación de una línea celular de cáncer de próstata C4-2B estable que co-expresa la IRF682 con el shARN contra mARN del gen *OLR-1*.**

La disminución de la expresión de LOX-1 en células C4-2B se obtuvo mediante la expresión constitutiva de un shARN contra el mARN de LOX-1. Para esto la línea celular C4-2B fue transducida con  $1 \times 10^8$  y  $2 \times 10^8$  partículas virales adeno-asociadas, AAV/IRF682/shARN-*OLR-1*, la cuales incorporan la secuencia codificante para un shARN contra el mARN del gen *OLR-1*, controlado por el promotor U6 para la polimerasa III y además, co-expresa la proteína trazadora IRF682. La transducción celular efectiva fue detectada mediante escáner de la placa de cultivo en el equipo de detección de fluorescencia infrarroja, y se observó fluorescencia en los pocillos transducidos (Fig. 17-A). Las células fueron seleccionadas mediante citometría acoplada a *cell sorter* en el equipo FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, EE.UU), la población de células con fluorescencia positiva correspondió al 1% del total de eventos detectados (Fig. 17-B). La población celular seleccionada se mantuvo en cultivo y se analizó la expresión de LOX-1 mediante PCR en tiempo real y *western-blot*.

A)



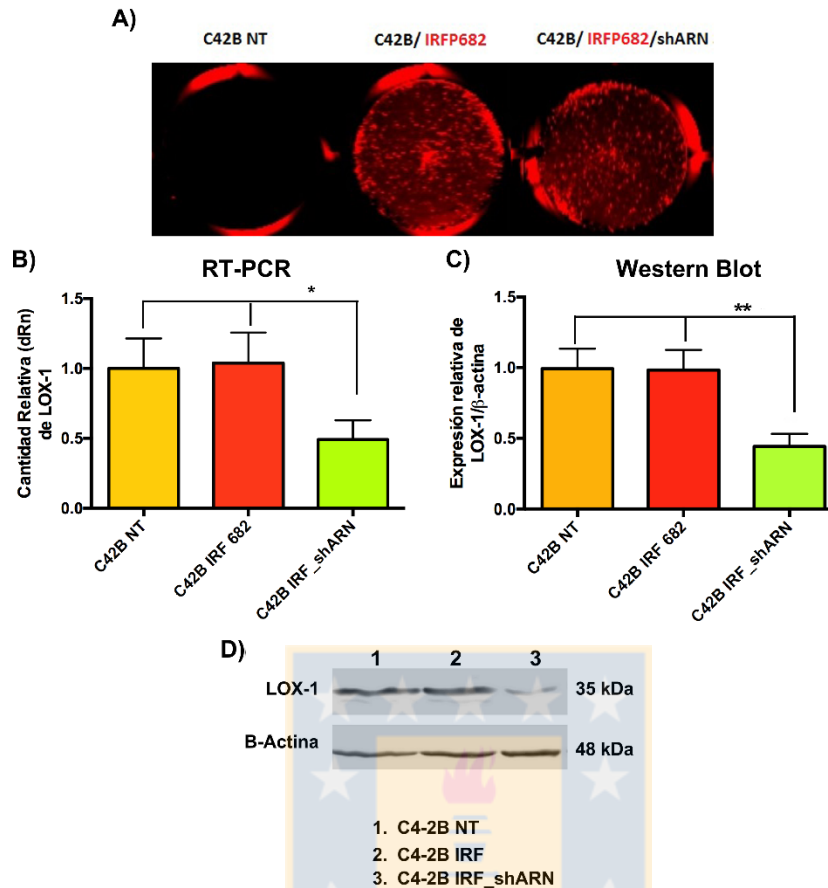
B)



**Figura 17: Transducción de células C4-2B con el vector adeno-asociado IRF682/shARN-OLR-1.** A) Las células C4-2B fueron transducidas con el vector AAV/IRFP/shARN-OLR-1 generado. La expresión de la proteína fluorescente infrarroja fue detectada a las 48 hrs post transducción, en el equipo de detección infrarroja Odissey CLX (Li-COR, EEUU) utilizando el canal de emisión de 700 nm. B) Representación en gráfico de puntos, al lado izquierdo se muestra el gráfico de *Forward scatter* (FSC) versus el *Side scatter* (SSC) correspondientes al tamaño y a la complejidad celular, respectivamente, para definir la población celular, a la derecha se representa el gráfico SSC versus Fluorescencia del canal APC que muestra la población de células C4-2B transducidas con el vector AAV/IRF682/shARN-OLR-1, y seleccionada a través de citometría de flujo con *cell sorter* en el equipo FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EE.UU) (Fuente: Elaboración propia).

La población de células C4-2B AAV/IRF682/shARN seleccionada fue escaneada en el equipo de detección infrarroja y se observó que expresa constitutivamente la proteína IRF682, además presenta una disminución del 50% de la expresión del mRNA codificante para LOX-1, respecto a la expresión basal del mRNA de LOX-1 presente en células C4-2B sin transducir y C4-2B AAV/IRF682 (control de transducción). Este resultado se verifica mediante *western-blot*, demostrándose que la línea C4-2B/IRF682\_shARN presenta una disminución significativa de la expresión de LOX-1 (Fig. 18).

A partir de que se demostró que las variantes modificadas de la línea celular C4-2B generadas en esta tesis sirven como modelo para el estudio de la influencia del receptor LOX-1 en procesos asociados a la progresión del cáncer de próstata, es necesario saber si la expresión de la proteína trazadora fluorescente infrarroja (IRF682) es proporcional al número de células. Para ello se sembraron por separado una cantidad creciente células C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN (de 2500 a 20.000 células por pocillo), y se escanearon en el equipo Odyssey CLX (LI-COR, EEUU). Como resultado se obtuvo que para ambas líneas, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682/shARN, existe una proporcionalidad directa entre el número de células y las unidades de fluorescencia emitida en el canal de 700 nm, además en este modelo *in vitro* no se observa una tasa de crecimiento diferencial entre las dos líneas celulares generadas (Fig. 19).



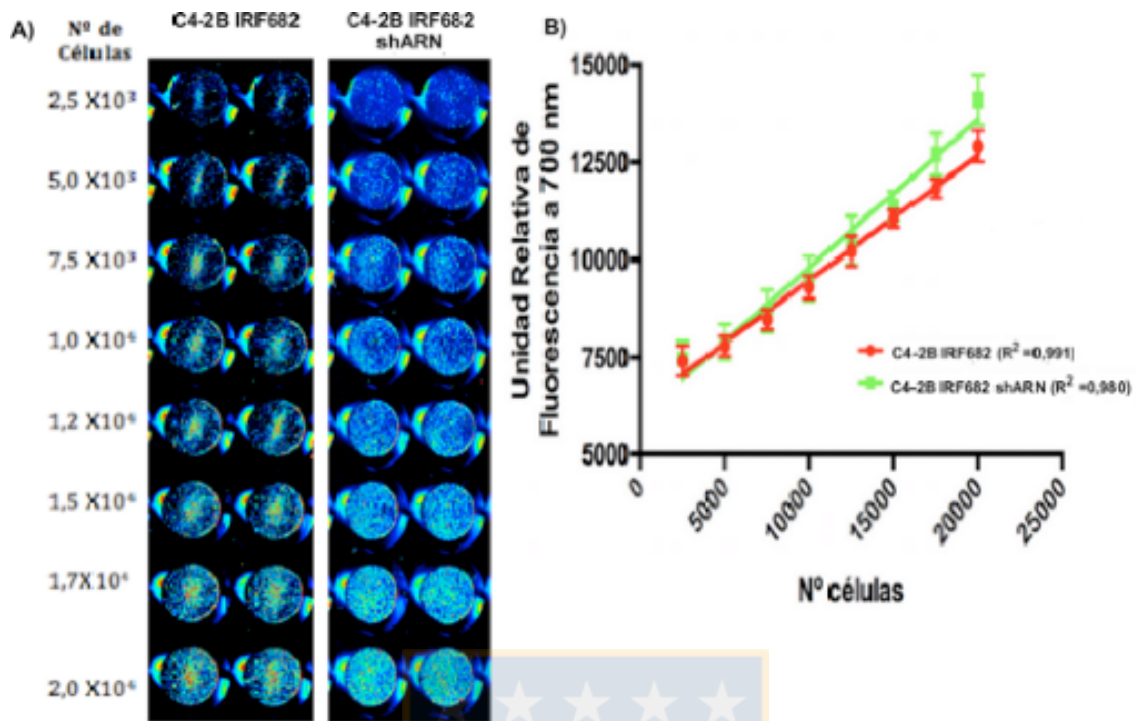
**Figura 18: Caracterización de las células C4-2B establemente transformadas con AAV/IRF682 y AAV /RF682/shARN-OLR-1**

**A)** Expresión de la IRFP682 en las variantes modificadas de la línea celular C4-2B seleccionadas por *sorting*, detectada a través del equipo de detección infrarroja Odissey CLX (Li-COR, EEUU).

**B)** Niveles de expresión relativa de mRNA de LOX-1 mediante PCR en tiempo real de muestras de mRNA total de las líneas celulares C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN. La gráfica representa las media  $\pm$  s.d. de tres experimentos independientes en triplicado. Estadística test t ( $***p \leq 0.001$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $*p \leq 0.05$ ).

**C)** Gráfica de las medias de las densidades de banda de LOX-1 normalizada por  $\beta$ -actina  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ .

**D)** *Western blot* para análisis de la expresión de LOX-1 en las células C4-2B líneas celulares C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN, comparando con el control de células C4-2B nativas. (Fuente: Elaboración propia).

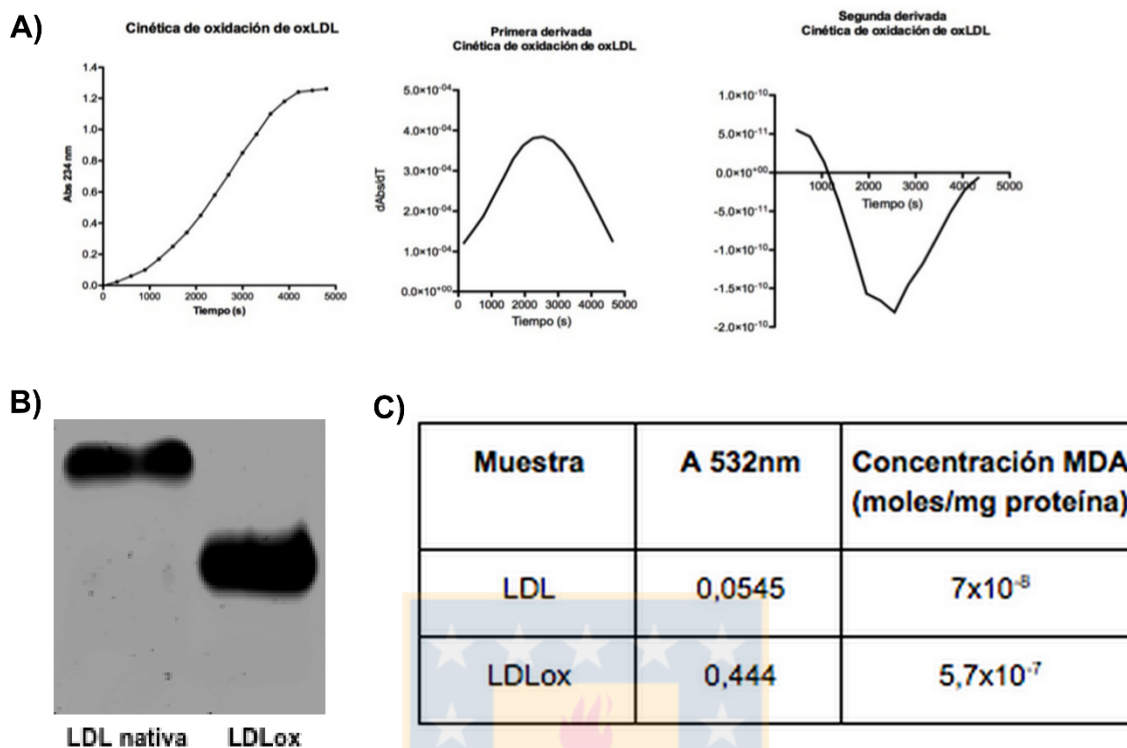


**Figura 19: Determinación de la respuesta lineal entre el número de células y las unidades relativas de fluorescencia en la línea celular estable C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN.** **A)** Imagen de células C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN sembradas en número creciente de 2500 a 20.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos obtenida por el equipo Odyssey CLX (Li-COR, EEUU). **B)** Gráfica comparativa del análisis de proporcionalidad entre número de células y fluorescencia emitida en el rango de infrarrojo de células C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN. La gráfica representa las media  $\pm$  s.d. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. (Fuente: Elaboración propia).



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

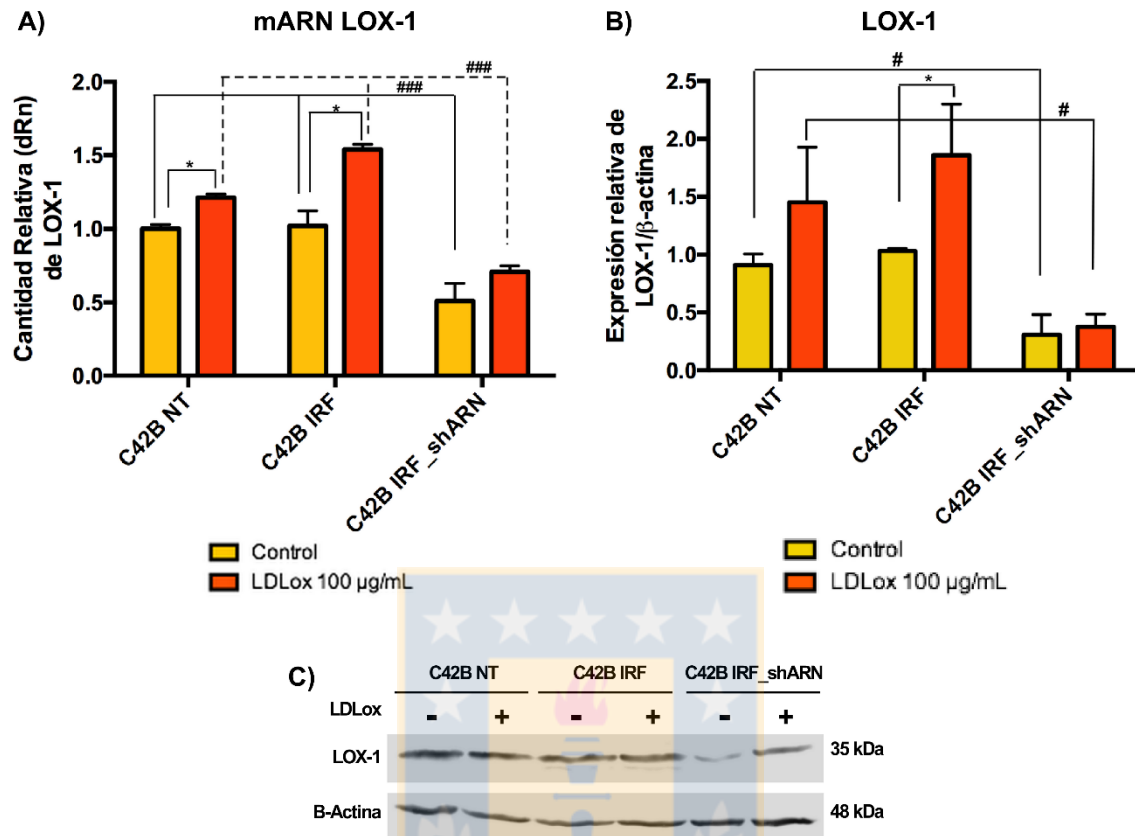
La LDL se obtuvo desde suero de pacientes normolipémicos mediante ultracentrifugación diferencial, se oxidó 1 mg/mL de LDL por 3 horas utilizando  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ . Se determinó que la LDL oxidada obtenida presentó una cinética de oxidación normal para LDL. De esta manera, a partir de la primera y segunda derivada de la cinética de oxidación de la LDL se obtuvo un tiempo de fase de retardo (fase lag) 1178 de segundos, un tiempo máximo de producción de dienos conjugados de 4373 segundos y una velocidad de propagación de unidades de absorbancia a 234 nm por segundo (Fig. 20-A). Uno de los cambios fisicoquímicos más importantes desencadenados por la lipoperoxidación de la LDL es el aumento en las cargas negativas expuestas en su superficie aumentando su movilidad electroforética respecto a LDL en geles de agarosa al 1% en buffer barbital. Se demostró que la LDLox generada para el desarrollo de este trabajo posee una movilidad electroforética mayor comparada con la LDL, con un  $R_f$  de 0,15 para LDL vs un  $R_f$  de 0,72 para LDLox (Fig. 20-B). Además, los procesos de lipoperoxidación lipídica generan aldehídos reactivos (ej: malondialdehído, MDA), como productos finales de oxidación. Analizamos su concentración en la LDLox generada en una reacción colorimétrica con ácido tiobarbitúrico y se determinó que la LDLox posee una mayor concentración de MDA que la LDL ( $5,7 \times 10^{-7}$  moles MDA/mg de proteína *versus*  $7 \times 10^{-8}$  moles MDA/mg de proteína, respectivamente). Por lo tanto, confirmamos que la LDLox presenta las características necesarias que confirman su correcta oxidación (Fig. 20-C).



**Figura 20: Generación de LDL oxidada mediante la oxidación de LDL con iones  $\text{Cu}^{2+}$ .** La LDL fue obtenida por ultracentrifugación diferencial desde una mezcla de sueros de donantes normolipémicos. Se oxidó 1 mg/mL de LDL utilizando  $\text{CuSO}_4$  (10  $\mu\text{M}$ ) durante 3 horas. **A)** Monitoreo de la cinética de oxidación de LDL utilizando detección espectrofotométrica de dienos conjugados a  $\lambda$  234nm, análisis de primera y segunda derivada para determinar los parámetros cinéticos de la oxidación de LDL. **B)** Análisis de migración electroforética de LDL y LDLox en gel de agarosa al 1%. **C)** Cuantificación de malondialdehído en la LDLox generada utilizando el método del ácido tiobarbitúrico (Fuente: Elaboración propia).

### **7.9 La LDLox incrementa la expresión del receptor LOX-1 y el uso de shARN dirigidos contra el mARN de LOX-1 previene este efecto.**

En estudios previos en nuestro laboratorio se determinó que la LDLox induce la expresión de LOX-1, en 3 líneas celulares de cáncer de próstata: LnCaP, C4-2 y DU-145. Para determinar si la LDLox induce la expresión en células de cáncer de próstata C4-2B analizamos su expresión frente al tratamiento con 100 µg/mL de LDLox . Se demostró que la LDLox induce un aumento significativo en la expresión del mARN de LOX-1 en células C4-2B nativas y C4-2B/IRF682 frente al control sin tratamiento (Fig. 21-A). Este resultado se condice en el análisis de la expresión de LOX-1 a nivel de proteínas en donde el tratamiento con 100 µg/mL de LDLox incrementa 1,5 y 1,7 veces la expresión de LOX-1 frente al control sin tratamiento (Fig. 21-B). De manera interesante la línea celular C4-2B/IRF682\_shARN que tiene una expresión relativa de LOX-1 basal significativamente menor respecto a las células control, el tratamiento con LDLox no indujo ningún cambio significativo en la expresión del receptor LOX-1 a nivel de mARN , ni a nivel de proteína (Fig. 21 A y B).



**Figura 21: Expresión de LOX-1 en las líneas células estables de cáncer de próstata C4-2B Nativas, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN expuestas a 100 µg/mL de LDLox.**

**A)** Niveles de expresión relativa LOX-1 mediante PCR en tiempo real de muestras de mARN total de las líneas celulares C4-2B Nativas, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN tratadas con LDLox (100 µg/mL) durante 24 hrs. La gráfica representa las media ± s.d. de tres experimentos independientes en triplicado. Análisis de varianza de un factor con post test de Dunnett (\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \* $p \leq 0.05$ ). **B)** Gráficas de las medias de las densidades de banda de LOX-1 normalizada por  $\beta$ -actina de células C4-2B Nativas, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN expuestas a 100 µg/mL de LDLox. ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de un factor \*  $P \leq 0,05$ . **C)** Bandas de *western blot* de LOX-1 y  $\beta$ -actina de células C4-2B Nativas, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN expuestas a 100 µg/mL de LDLox. Se utilizó como anticuerpo primario IgG Anti-OxLDL R-1 (E-19) en título y el anticuerpo anti- $\beta$ actina hecho en ratón en título y los anticuerpos secundarios anti IgG de cabra conjugado con Alexa Fluor 790 y anti- IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 680 ambos en título 1/5000. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para detección infrarroja Odyssey CLX (Li-COR, EE.UU) (Fuente: Elaboración propia).

### **7.10 La LDLox induce la expresión de marcadores pro-angiogénicos en las células C4-2B y este efecto depende del receptor LOX-1.**

El aporte de oxígeno y nutrientes es esencial para la función y supervivencia celular. La formación de redes vasculares en el tumor, permite el suministro de nutrientes, oxígeno, además de facilitar la diseminación de células tumorales por la circulación sanguínea, promoviendo la migración de estas células a regiones y órganos distantes (metástasis) [130, 164]. Por ello, la generación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso imprescindible para el desarrollo y progresión tumoral [165]. La angiogénesis está regulada por el equilibrio entre factores inductores e inhibidores. Los tumores tienen la capacidad de activar la angiogénesis inclinando la balanza a favor de los inductores de este proceso, como VEGF, metaloproteinasa 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) [165].

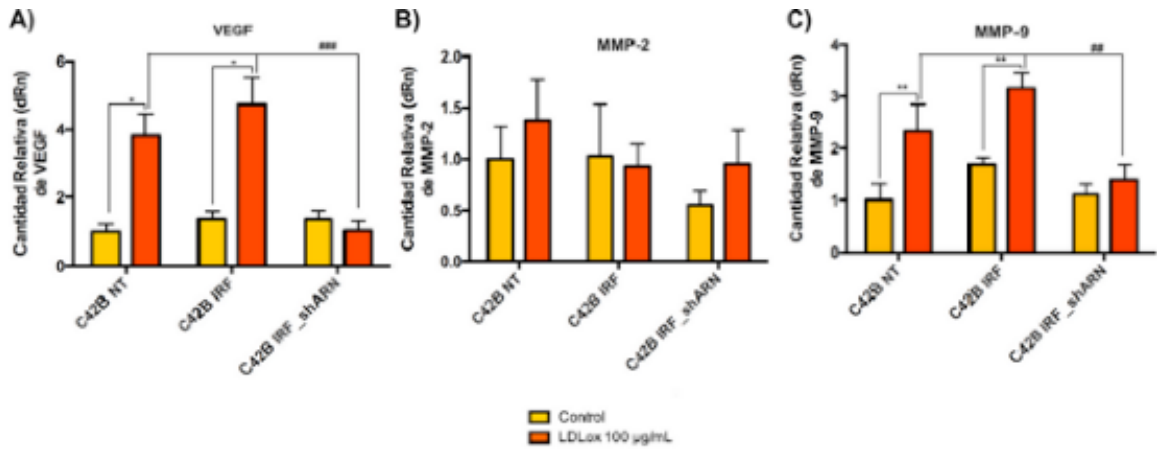
En estudios previos de nuestro laboratorio se determinó que la LDLox induce la expresión de marcadores pro-angiogénicos, en 3 líneas celulares de cáncer de próstata: LnCaP, C4-2 y DU-145. Con el propósito de estudiar la función de LOX-1/LDLox sobre la angiogénesis en células de cáncer de próstata C4-2B, se analizó la expresión de marcadores pro-angiogénicos: VEGF, MMP-2 y MMP-9,. Para ello células C4-2B se incubaron con 100 µg/mL de LDLox, y se cuantificó la expresión relativa de los marcadores, mediante PCR en tiempo real y *western blot*.

Los resultados muestran que las células C4-2B Nativas y C4-2B/IRF682 estimuladas con 100 µg/mL de LDLox aumenta 4 veces la expresión de mRNA de VEGF frente al control sin estímulo (Fig. 22-A). Para la expresión de MMP-9 la tendencia de los resultados fue similar a la observada para VEGF (Fig. 22-C). Las células C4-2B nativas y C4-2B/IRF682 tratadas con LDLox aumentan al doble la expresión de estos marcadores respecto al control sin tratamiento. En el caso de MMP-

2 , no se logra observar cambios significativos a nivel de mensajero, en las células C4-2B Nativas y C4-2B/IRF682 tratadas con LDLox (Fig. 22-C).

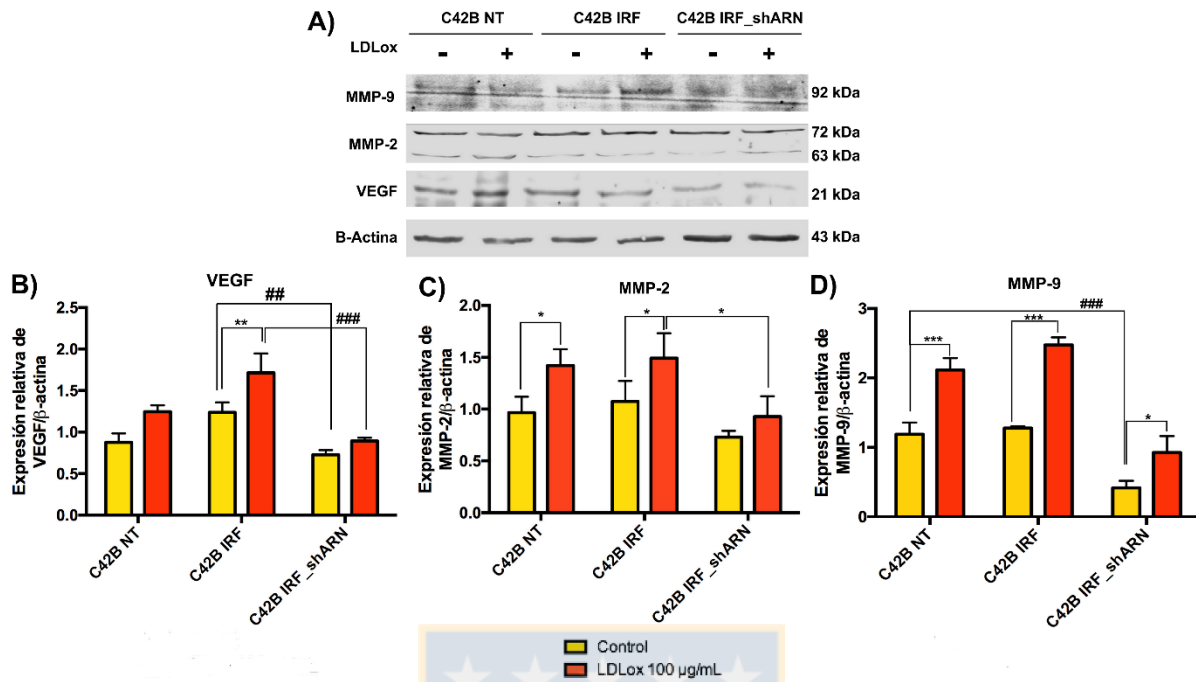
De manera interesante en la línea celular C4-2B que expresa el shARN contra LOX-1, se logró prevenir el aumento de la expresión de VEGF, MMP-2 y MMP-9, demostrando que el incremento en la expresión de VEGF, las metaloproteinasas de matriz está mediado por el receptor LOX-1 (Fig. 22). A nivel de proteínas en las células C4-2B nativas y C4-2B/IRF la expresión de los marcadores pro-angiogénicos VEGF, MMP2 y MMP-9 aumenta significativamente 1,5, 1,4 y 2 veces respectivamente en presencia del ligando LDLox, y este efecto se previene de manera significativa en la línea celular generada, C4-2B/IRF682\_shARN (Fig. 23).





**Figura 22: La expresión del receptor LOX-1 y su activación con LDLox aumenta la expresión mRNA de factores pro-angiogénicos y este efecto depende del receptor LOX-1.** Cuantificación relativa de factores pro-angiogénicos en células de cáncer de próstata C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN incubadas con o sin LDLox (100 µg/ml) por 24 horas, evaluado mediante PCR en tiempo real A) Cuantificación relativa de VEGF, B) Cuantificación relativa de MMP-2 y C) Cuantificación relativa de MMP-9. Las gráficas representan la media  $\pm$  s.d. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Análisis de varianza de un factor con post test de Dunnett ( $***p \leq 0.001$ ,  $**p \leq 0.05$ ,  $*p \leq 0.01$  o  $###p \leq 0.001$ ,  $##p \leq 0.05$ ,  $#p \leq 0.01$ ). (Fuente: Elaboración propia).





**Figura 23: La expresión del receptor LOX-1 y su activación con LDLox aumenta la expresión de factores pro-angiogénicos y este efecto depende del receptor LOX-1.**

**A)** Las células C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN fueron incubadas con o sin LDLox (100  $\mu$ g/ml) por 48 horas. Posteriormente, se analizó la expresión de 3 marcadores pro-angiogénicos (VEGF, MMP-2, y MMP-9) en muestras de proteínas totales mediante *western blot*, utilizando los anticuerpos primarios: monoclonal anti-VEGF humano, policlonal anti-MMP2 humana, anticuerpo policlonal anti-MMP-9 humana y el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$  actina humana. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo conjugados a Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para la detección Infrarroja Odyssey CLX (Li-COR, EE.UU). **B), C) y D)** Gráficas que representan las medias de las densidades de las bandas de proteínas VEGF, MMP-2 y MMP-9 respectivamente, normalizadas por  $\beta$ -actina  $\pm$  s.d. de tres experimentos independientes. Estadística realizada con análisis de varianza de un factor con post test de Dunnett (\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.05$ , \* $p \leq 0.01$  o ### $p \leq 0,001$ , ## $p \leq 0,05$ , # $p \leq 0.01$ ). (Fuente: Elaboración propia).



### **7.11 La LDLox induce la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en las células C4-2B y este efecto depende del receptor LOX-1.**

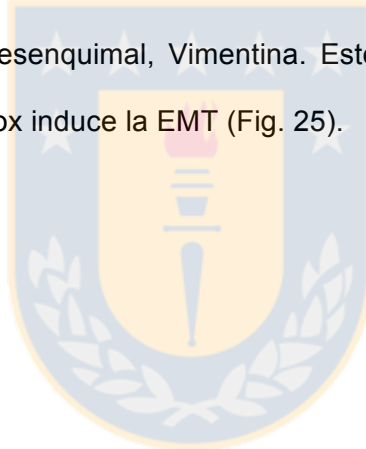
La transición epitelio mesenquimal (EMT) en cáncer es un proceso determinante en la invasión tumoral y la metástasis. En este proceso las células epiteliales pierden varias de sus características y adquieren, características propias de las células mesenquimales, aumentando la secreción de proteasas de matriz y reorganizando su citoesqueleto para desarrollar estructuras celulares que le otorguen capacidad migratoria e invasiva [166]. En estudios previos en nuestro laboratorio se determinó que la LDLox induce el aumento en la expresión de marcadores mesenquimales y la disminución, de marcadores epiteliales en células LNCaP, C4-2 y DU-145.

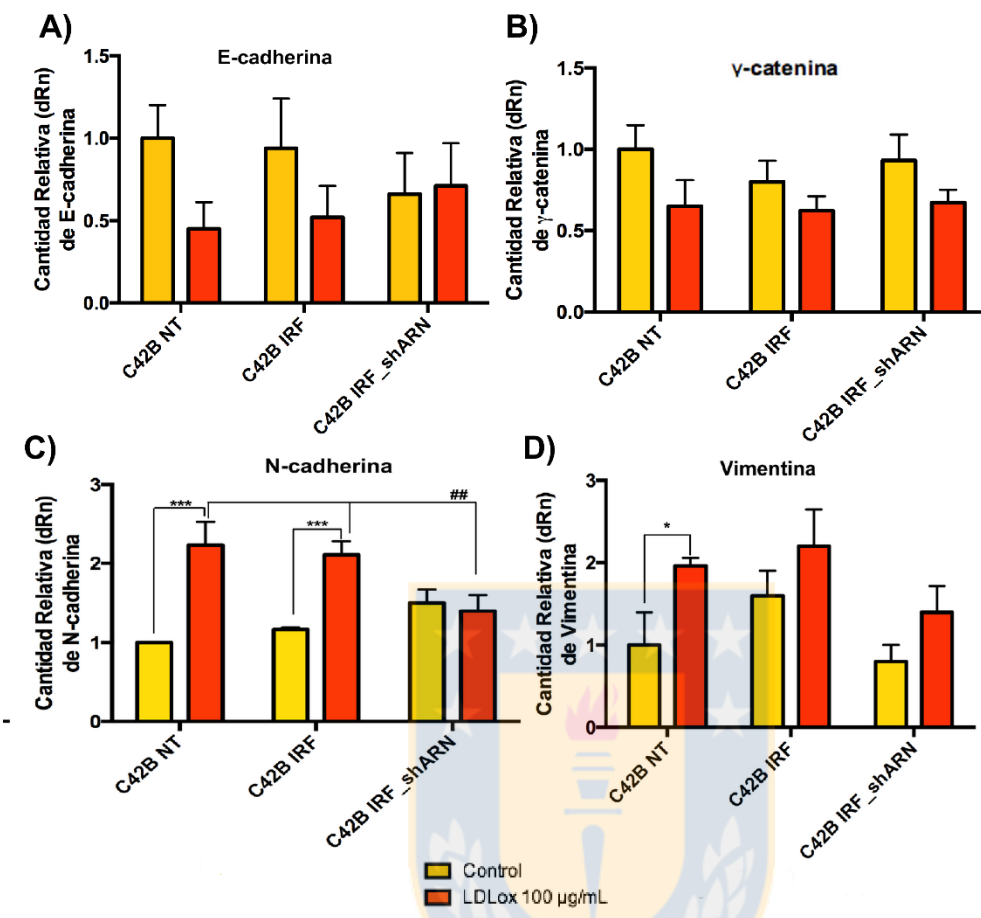
Con el propósito de estudiar la función de LOX-1/LDLox sobre la EMT en células de cáncer de próstata C4-2B, se analizó la expresión de marcadores epiteliales: E-cadherina, y  $\gamma$ -catenina (Plakoglobina) y marcadores mesenquimales: Vimentina y N-cadherina. Para ello las células C4-2B se incubaron con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LDLox, y se cuantificó la expresión relativa de los marcadores, mediante PCR en tiempo real (Fig.24) y *western blot* (Fig.25).

Los resultados muestran que las células C4-2B Nativas y C4-2B/IRF682 estimuladas con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LDLox aumentan al doble la expresión del mRNA de los marcadores mesenquimales Vimentina y N-cadherina, frente al control sin estímulo. Por otra parte en la expresión de marcadores epiteliales E-cadherina y  $\gamma$ -Catenina, no se observan cambios significativos ante el estímulo con LDLox, pero en el caso de E-cadherina se observa una tendencia a la disminución. A nivel de mRNA no hay diferencias significativas en ninguno de los marcadores en la línea celular C4-2B con expresión reducida de LOX-1 (Fig. 24).

A nivel de proteínas en las células C4-2B nativas y C4-2B/IRF682 tratadas con LDLox presentan una disminución del 40% en la expresión de E-cadherina frente a los respectivos controles sin tratamiento, en el caso de  $\gamma$ -catenina disminuye un 70% y 40% su expresión en células C4-2B nativas y C4-2B/IRF682, respectivamente. Y el marcador mesenquimal Vimentina aumenta su expresión en 2 y 3,1 veces en células C4-2B Nativas y C4-2B/IRF682 tratadas con LDLox versus sus controles sin tratamiento (Fig. 25).

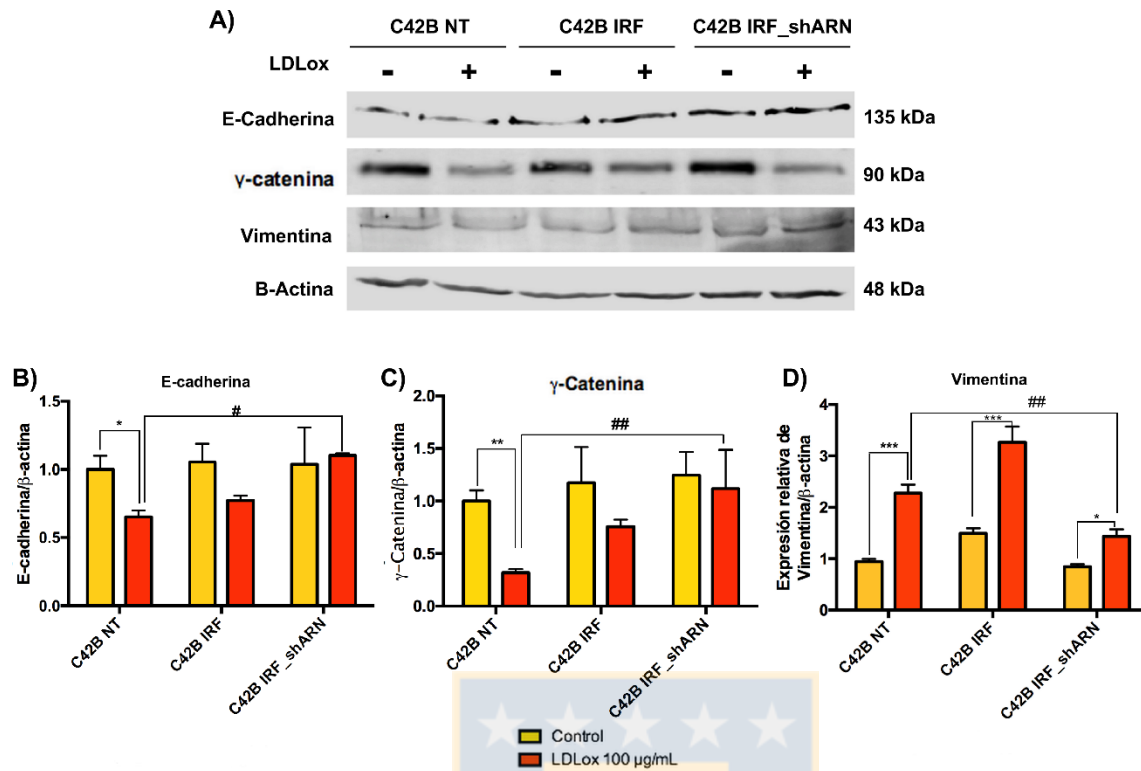
De manera interesante a nivel de proteína se logra apreciar que en las células C4-2B con expresión reducida del receptor LOX-1, se previene el efecto del ligando LDLox, manteniendo los niveles basales de los marcadores epiteliales E-cadherina y  $\gamma$ -Catenina, y del marcador mesenquimal, Vimentina. Estos resultados sugieren que la activación de LOX-1 por LDLox induce la EMT (Fig. 25).





**Figura 24: Expresión relativa de mRNA de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células, C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN, tratadas con y sin LDLox.** Cuantificación relativa de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células de cáncer de próstata C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN incubadas con o sin LDLox (100 µg/ml) por 24 horas, evaluado mediante PCR en tiempo real.

**A)** Cuantificación relativa de E-cadherina, **B)** Cuantificación relativa de γ-catenina  
**C)** Cuantificación relativa de N-cadherina y **D)** Cuantificación relativa de Vimentina. La gráfica representa la media ± s.d. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Análisis de varianza de un factor con post test de Dunnett (\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.05$ , \* $p \leq 0.01$  o ##  $p \leq 0,001$ , #  $p \leq 0,05$ , #  $p \leq 0.01$ ). (Fuente: Elaboración propia).



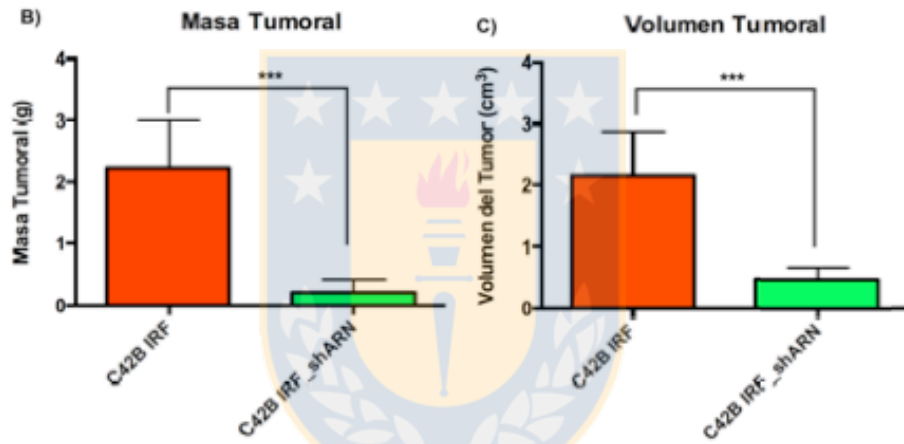
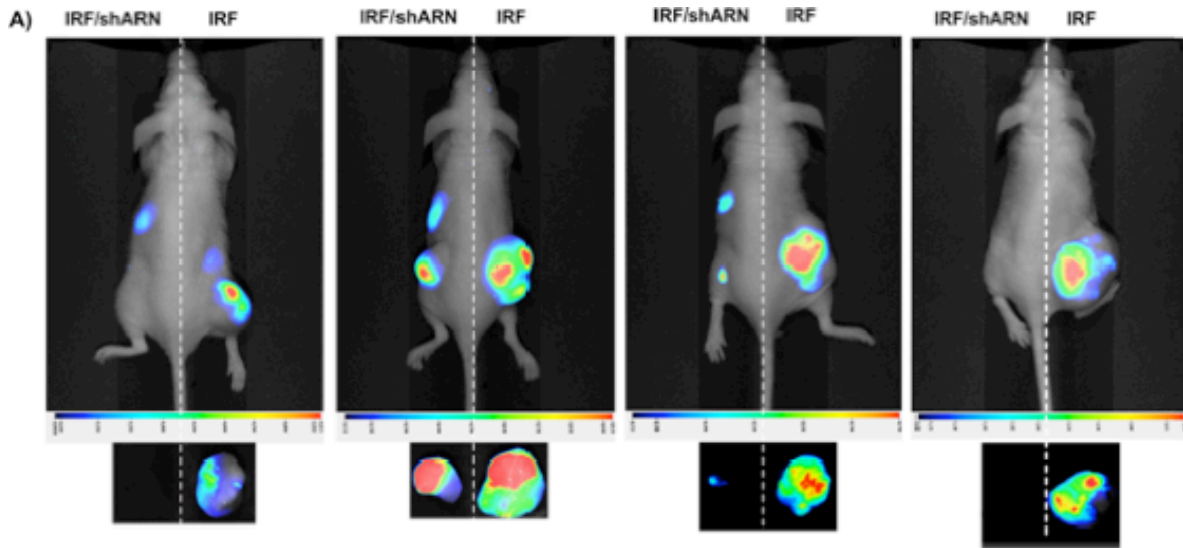
**Figura 25: Expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en células, C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN, tratadas con y sin LDLox.**

**A)** Las células C4-2B, C4-2B/IRF682 y C4-2B/IRF682\_shARN fueron incubadas con o sin LDLox (100 µg/ml) por 48 horas. Posteriormente, se analizó la expresión de 3 marcadores EMT (E-cadherina, Y- catenina y Vimentina) en muestras de proteínas totales mediante *western blot*, utilizando los anticuerpos primarios: monoclonal anti-E-cadherina humana, policlonal anti- Y- catenina humana, anticuerpo policlonal anti-vimentina humana y el anticuerpo monoclonal anti-β actina humana. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de ratón, anti- IgG de conejo y anti-IgG de cabra conjugados a Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 790. Las membranas fueron reveladas utilizando el equipo para la detección Infrarroja Odyssey CLX (Li-COR, EE.UU).

**B), C) y D)** Gráficas que representan las medias de las densidades de las bandas de proteínas E-cadherina, Y- catenina y Vimentina respectivamente, normalizadas por β-actina ± s.d. de tres experimentos independientes. Estadística realizada con análisis de varianza de un factor con post test de Dunnett (\*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\* $p \leq 0.05$ , \* $p \leq 0.01$  o # #  $p \leq 0,001$ , # #  $p \leq 0,05$ , #  $p \leq 0.01$ ). (Fuente: Elaboración propia).

### **7.12 LOX-1 es determinante para el crecimiento de *xenograft* sub-cutáneos de células de cáncer de próstata C4-2B.**

Resultados previos de nuestro laboratorio, en donde se realizaron ensayos de potencial tumorigénico evidenciaron que LOX-1 podría ser necesario para el crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata C4-2. Para determinar la relevancia de LOX-1 en el crecimiento tumoral *in vivo*, se inocularon  $3 \times 10^6$  de: células C4-2B/IRF682 (control) en la región dorsal inferior derecha y células C4-2B/IRF682\_shARN en la región dorsal inferior izquierda de ratones *nude* machos de 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer durante 8 semanas, y posteriormente se cuantificó la masa y volumen tumoral en cada uno de los casos. Como primer resultado se pudo observar que las células C4-2B transducidas con vectores adeno-asociados AAV/IRF682 y AAV/IRF682\_shARN, expresan establemente la proteína trazadora IRF 682 la que se pudo detectar al crecer los tumores en equipo Li-COR *Pearl Impulse*. Se determinó que el tamaño y volumen tumoral es significativamente menor en la línea celular C4-2B/IRF682\_shARN en comparación con la línea celular C4-2B/IRF682 control. Estos resultados demuestran que LOX-1 es un componente importante para el crecimiento tumoral de células humanas de cáncer de próstata C4-2B (Fig. 26).



**Figura 26:** Ensayo de crecimiento tumoral de *xenografts* subcutáneos de células C4-2B/IRF682\_shARN y C4-2B/IRF 682 (control) en ratones *nude*. **A)** Imágenes de los ratones *nude* machos de 6 semanas de edad, inoculados con  $3 \times 10^6$  de células: C4-2B/IRF682\_shARN en la región dorsal izquierda y C4-2B/IRF682 en la región dorsal derecha. Los *xenografts* crecieron durante 8 semanas, y posteriormente se cuantificó la masa y volumen tumoral en cada uno de los casos. Imágenes obtenidas por el equipo *Pearl Impulse* (Li-COR EEUU). **B) y C)** Gráficas que representan la masa y volumen de los tumores, respectivamente, con  $\pm$  la desviación estándar con una  $n$  experimental de 4 animales. Análisis estadístico test t (\*\*\*) $p \leq 0.001$ , \*\*) $p \leq 0.01$ , \*) $p \leq 0.05$ . (Fuente: Elaboración propia).

## 8 Discusión

El cáncer de próstata se considera el cáncer con mayor incidencia en la población masculina en Chile. En el año 2012 se presentaron 5681 pacientes con diagnóstico confirmado y se estima que para el año 2030 el número de casos nuevos de cáncer de próstata se duplicará [2]. La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer de próstata es una temática importante en la actualidad, debido a que los tratamientos estándar incluyen cirugías, quimioterapia, radioterapia y terapia de deprivación androgénica [31], sin embargo, ninguna de estas alternativas erradica totalmente el cáncer prostático, generando diversos efectos secundarios que menoscaban la integridad física y psicológica de los pacientes. Además, la mayoría de los pacientes con cáncer de próstata con tratamiento anti-hormonal progresan eventualmente a un estado refractario, haciéndolos no respondedores a la manipulación hormonal adicional y resistentes a la quimioterapia [31]. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer de próstata [167].

Como estrategia terapéutica se plantea la aplicación de terapia génica, que ya es una alternativa existente, donde el tratamiento va dirigido a una molécula blanco específica, disminuyendo la posibilidad de generar daño colateral a tejidos u órganos sanos. Dentro de las consideraciones importantes para diseñar una terapia génica exitosa es que sea segura para el paciente, eficiente y que sea dirigida a un linaje celular específico. Por eso es que aproximadamente el 70% de los ensayos clínicos de terapia génica utilizan sistemas de administración basados en vectores virales [168]. A la fecha se han realizado ensayos clínicos de terapia génica en cáncer de pulmón, piel, y tumores gastrointestinales [168]. Como blancos moleculares se han utilizado: factores supresores de tumores, immuno-estimuladores [82], virus oncolíticos [81], factores anti-angiogénicos [83], entre otros. Un precedente importante para la aplicación de terapia

génica fue que en Estados Unidos el 2015 se aprobó la primera terapia con vectores virales recombinantes, que utilizaba un virus Herpes oncolítico para el tratamiento de melanoma [169]. En la actualidad el uso de vectores virales recombinantes adeno-asociados se incrementó debido a que es un sistema de entrega eficiente, presentan baja patogenicidad para el huésped y tiene alto potencial de aplicación en tratamientos para el cáncer [46].

Con esos antecedentes podríamos plantear que LOX-1 puede ser considerado un blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer de próstata. Por eso en esta tesis planteamos como hipótesis que “la transducción de shARNs dirigidos contra el receptor LOX-1, mediante el empleo de vectores adeno-asociados, reduce la tasa de crecimiento en modelos celulares de cáncer de próstata”.

### **8.1 Generación de una línea celular estable de cáncer de próstata C4-2B, con expresión reducida del receptor LOX-1.**

El receptor LOX-1 es una proteína de membrana tipo II que fue inicialmente identificado como el principal receptor para LDLox en células endoteliales [100]. Estudios posteriores demostraron que este receptor también está expresado en monocitos, plaquetas, cardiomiocitos, células musculares lisas vasculares, tejido renal, pulmonar, neuronal, placentario, médula y aorta. Además, se demostró que la expresión de LOX-1 es mínima en algunos tejidos y células tales como: linfocitos, bazo, timo, ganglios linfáticos y glándula prostática [170]. Si bien la expresión de LOX-1 bajo condiciones fisiológicas es mínima, su expresión se induce bajo condiciones fisiopatológicas como la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión, la isquemia miocárdica, aterosclerosis, difusión endotelial, dislipidemia, obesidad y cáncer [160, 171-177] .



En estudios previos de nuestro laboratorio se evaluó la expresión del receptor LOX-1 en células de cáncer prostático humana, y se demostró que LOX-1 se encuentra sobre expresado en las líneas de cáncer de próstata humanas LNCaP, C4-2, C4-2B, DU-145, PC3 y RWPE-2, respecto a la expresión basal de líneas celulares de epitelio prostático normal, como RWPE-1. Observándose además, que el mRNA de LOX-1 se encuentra sobre-expresado en adenocarcinomas prostáticos y tejido metastásico de pacientes con cáncer de próstata [143].

Los resultados obtenidos por otros grupos de investigación respaldan este hallazgo, Hirsh y colaboradores en el año 2010 describen la expresión de LOX-1 en adenocarcinomas mamarios y prostáticos de estadios clínico patológicos avanzados, y demuestran por primera vez que LOX-1 está involucrado en procesos de transformación celular en cáncer de mama [160]. Igualmente los análisis comparativos de perfiles de expresión de cáncer colorectal metastásico sincrónico y metacrónico muestran que el receptor LOX-1 se encuentra sobre-expresado en ambos tipos de cáncer y que este podría tener una función crucial en la metástasis del cáncer colorectal [178].

Por otra parte, se ha descrito que los niveles de expresión de LOX-1 en combinación con el índice de masa corporal, pueden ser utilizados para el pronóstico clínico de pacientes con cáncer de pulmón de células escamosas no-pequeñas [179]. Igualmente, la triada de genes *LOX-1*, *CXCL11* y *ADAMDEC1*, se describen como marcadores predictivos validados para determinar la condición clínico-patológica de pacientes con cáncer gástrico [180].

En consecuencia, la sobre-expresión de LOX-1 que observamos en células y tejido de cáncer próstata podría no ser un fenómeno inherente a este tipo de neoplasia, sino a un evento recurrente observado en otros tipo de neoplasias como el cáncer de mama, colo-rectal, pulmón de células no-pequeñas y gástrico. Estos antecedentes en su conjunto refuerzan nuestra idea de considerar al receptor LOX-1

como blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer de próstata, contra el cual diseñar una nueva estrategia farmacológica.

Por ello, en el presente trabajo nos enfocamos en generar un mecanismo para inhibir la expresión del gen de interés, basándonos en el uso de ARN de interferencia (ARNi) expresados en vectores virales adeno-asociados. El trabajo experimental en esta tesis se inició con la generación de un vector adeno-asociado que contiene la secuencia codificante para un shARN dirigido contra el gen de LOX-1, bajo el control del promotor de U6, y además co-expresa una proteína trazadora fluorescente infrarroja (IRFP). También se generó un vector adeno-asociado que expresa una proteína trazadora IRFP, como control. Los vectores generados se transfectaron en células HeLa, estas células se utilizaron como modelo porque expresan de manera constitutiva el receptor LOX-1. Se observó que todos los vectores son funcionales para la expresión de IRFP, y aquel que contienen la secuencia de shARN disminuyen la expresión del receptor LOX-1 en dichas células (Fig. 14).

La secuencia codificante shARN se incorporó al genoma de las células de cáncer de próstata C4-2B mediante transducción con vectores virales recombinantes adeno-asociados. La transducción del material genético mediante sistemas recombinantes adeno-asociados tiene como ventajas: la integración del material genético al genoma celular de forma estable en el tiempo y es sitio-específica, la capacidad de transducir células en división o quiescentes y poseer un amplio tropismo celular, y si se piensa en su potencial como estrategia terapéutica para el tratamiento en cáncer, este sistema presenta ventajas como una baja inmunogenicidad e inmunotoxicidad para el paciente [181].

Como resultado de esta etapa se obtuvo una línea celular estable de células de cáncer de próstata C4-2B con una disminución en la expresión del receptor LOX-1, demostrado mediante PCR en tiempo real y western-blot (Fig. 18). Este modelo celular

se utilizó como herramienta para estudiar la implicancia del receptor LOX-1 en la angiogénesis, la transición epitelio mesenquimal y el crecimiento tumoral en cáncer de próstata.

## **8.2 La LDLox incrementa la expresión del receptor LOX-1 y el uso de shARN dirigidos contra el mRNA de LOX-1 previene este efecto.**

En estudios epidemiológicos y experimentales se ha relacionado la obesidad con el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer a través de múltiples mecanismos [182, 183]. En este sentido los mecanismos subyacentes al desarrollo de la aterosclerosis asociados a perturbaciones del metabolismo lipídico podrían tener importantes implicaciones en el desarrollo y la progresión del cáncer [160, 184]. Estudios con pacientes obesos han demostrado que presentan mayores concentraciones circulante de LDLox en comparación con individuos normo peso [185-187]. Además, estudios previos de correlación demostraron una asociación entre el aumento en los niveles LDLox en pacientes obesos y un incremento en el riesgo de desarrollar metástasis en cáncer de próstata [94]. En este contexto, la LDLox tiene un efecto importante en la progresión del cáncer de próstata y es que uno de los mecanismos por los cuales este cáncer se vuelve refractario a las terapias anti-androgénicas utilizadas actualmente, es porque las células tumorales tienen una vía de síntesis de andrógenos endógena a partir de colesterol [188]. Como el microambiente tumoral se caracteriza por ser un ambiente oxidante, se define que la forma mas probable de captación colesterol como del precursor de la síntesis de andrógenos es en su forma oxidada (LDLox) [189].

La LDLox es el principal ligando para LOX-1 e induce la expresión de este receptor en células endoteliales macrófagos y células musculares lisas [102]. La

expresión de LOX-1 inducida por LDLox ha sido clásicamente reportada en cultivos celulares de endotelio de aorta bovina tratadas con concentraciones crecientes de LDLox (3-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [116]. Del mismo modo, uno de los principales constituyentes lisofosfolipídicos de la LDLox, la lisofosfatidilcolina, también induce la expresión de LOX-1 de forma dosis dependiente en un rango de concentraciones entre 1-100  $\mu\text{M}$  en células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas [190].

Resultados obtenidos recientemente de nuestro laboratorio demostraron que en 3 líneas celulares de cáncer próstata LnCaP, C4-2 y DU-145, estimuladas con LDLox, se indujo un aumento significativo en la expresión del receptor LOX-1, en forma dependiente de las concentraciones de LDLox, y que entre concentraciones de 1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LDLox no se presentan efectos citotóxicos en las líneas celulares de cáncer de próstata estudiadas [191]. Los resultados de esta tesis muestran que la línea celular C4-2B siguen la misma tendencia, aumentando significativamente la expresión de LOX-1 al ser tratada con LDLox a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig 21). Notoriamente, también se observó que el efecto de la activación de LOX-1 con LDLox es prevenido en la línea celular C4-2B con expresión reducida del receptor LOX-1, C4-2B/IRF/shARN OLR-1, tal como se reportó para células endoteliales de aorta carotídea humana (HCAEC) tratadas con ARN antisentido para el ARNm de LOX-1 [192]. Además, estos resultados coinciden con otros estudios en donde se ha bloqueado el receptor LOX-1 con anticuerpos dirigidos contra en sitio de unión a ligando y se previene el aumento en la expresión de LOX-1 mediada por LDLox y lisofosfatidilcolina, sugiriendo que LOX-1 favorece su propia transcripción [116, 190].

### **8.3 La LDLox induce la expresión de marcadores pro-angiogénicos en las células C4-2B y este efecto depende del receptor LOX-1.**

La angiogénesis tumoral es una característica distintiva del cáncer identificada como un componente crítico en la progresión del cáncer, que facilita el crecimiento tumoral y la metástasis. Las células tumorales y células del estroma tumoral secretan factores pro-angiogénicos en respuesta a hipoxia, entre estos se encuentran: el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEFG), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los cuales estimulan a las células endoteliales quiescentes de la vasculatura cercana iniciando la migración y generación de brotes vasculares hacia la masa tumoral [193].

La progresión de varias enfermedades, incluido el cáncer, está dirigida por un aumento en la respuesta angiogénica [165, 194], y la angiogénesis se regula mediante un balance entre moléculas anti- y pro-angiogénicas [195], secretadas por células endoteliales, células tumorales y del estroma [196].

En esta tesis mediante análisis *in vitro*, se determinó que células C4-2B responden al tratamiento con LDLox, mostrando un incremento significativo de 4 marcadores pro-angiogénicos: VEGF, Angiotensina II, MMP-2 y MMP-9 (Fig. 23). Estos resultados concuerdan con información previa, donde LOX-1 presenta un importante asociación con procesos angiogénicos [120, 197-199]. Una explicación para esto es que los altos niveles de colesterol están correlacionados con un aumento en la expresión de VEGF en suero y puede ser el origen de la sobre-expresión de factores pro-angiogénicos. En ensayos *in vitro* se demostró que la estimulación de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano con LDLox activan LOX-1, y consecuentemente, la expresión de factores estimuladores de angiogénesis como: moléculas de adhesión, proteínas inflamatorias, factores tisulares y proteínas de remodelación, como MMP-2 y MMP-9 [197]. Además, Kanata y colaboradores refieren

que la LDLox aumenta notablemente la expresión de VEGF, efecto que es atenuado por el tratamiento con un anticuerpo anti-LOX-1 [200]. Por su parte, la degradación de la membrana basal por metaloproteinasas de matriz es un proceso esencial para la inducción de angiogénesis y de migración e invasión tumoral. Al liberar varias moléculas como VEGF y TGF- $\beta$ , garantiza su difusión al medio extracelular, promoviendo la angiogénesis y el crecimiento tumoral [201, 202]. Se demostró que el VEGF-A modula la producción y la actividad de las metaloproteinasas de matriz [203], y que la expresión de MMP-2 es esencial para cambiar al fenotipo angiogénico durante el desarrollo de condrosarcoma humano y la progresión de tumores de células plasmáticas [204]. Además, se demostró que la supresión de MMP-2 inhibe la transición desde la etapa pre-vascular a la etapa vascular durante la progresión tumoral [204]. Bergers y colaboradores mostraron que la MMP-9 es un componente funcional del "switch angiogénico" durante la formación de vasculatura en los distintos estadios de la neoplasia pancreática. Además, demostraron que la activación de la MMP-9 induce una sobre-expresión de VEGF-A. Por el contrario, la pérdida de función de MMP-9 en tumores sólidos, no bloqueó el crecimiento tumoral por completo, lo que sugiere la existencia de vías alternativas o una redundancia en la movilización de proteinasas [202]. Dado que la expresión y actividad biológica de MMP-9 y VEGF-A se incrementa por la expresión de NADPH oxidasa -1 (Nox1), se considera que la formación de especies reactivas del oxígeno es un factor importante en el "switch angiogénico" [205].

Notoriamente, en el presente trabajo también se observó que el efecto de la activación de los marcadores pro-angiogénicos VEGF, MMP-2 y MMP-9 en la línea celular C4-2B mediado por el tratamiento con LDLox es prevenido por una expresión reducida del receptor LOX-1 a nivel de mensajero y proteína (Fig. 22 y 23). Estos resultados sugieren que la activación de LOX-1 está relacionada a la angiogénesis tumoral mediante un mecanismo molecular que incrementa la expresión de VEGF [206].

Un mecanismo propuesto para este fenómeno es que la hipoxia, principal inductor de la angiogénesis, tanto en aterosclerosis como en tumorigénesis, induce la sobre-expresión del receptor LOX-1 y activa a la sub-unidad p47phox de NADPH oxidasa [207]. Entonces, la producción de ROS mediada por NADPH oxidasa activa quinasas que fosforilan la sub-unidad inhibitoria de NF- $\kappa$ B ( $\text{I}\kappa\text{B}$ ) [157], permitiendo la traslocación de NF-  $\kappa$ B hacia el núcleo para promover la expresión de genes blancos que presenten un elemento de respuesta para este factor de transcripción, como es el caso de VEGF y MMP-9. Esto permite el desarrollo de angiogénesis y promueve procesos de migración e invasión tumoral [198, 208].

Nosotros postulamos que un aumento en la concentraciones de LDL y su subsecuente oxidación en el micro ambiente tumoral potenciaría la angiogénesis tumoral mediada por el receptor LOX-1. Una de las condiciones patológicas que cursa con un aumento en la concentraciones de LDL y las formas oxidadas de estas lipoproteínas es la obesidad [185-187]. En este sentido, la evidencia experimental con modelos animales TRAMP alimentados con dietas hipercalóricas demuestra que los tumores obtenidos desde animales obesos poseen un mayor grado de vascularización que los tumores procedentes de animales normopeso. Además, los animales obesos presentaron una tasa de crecimiento tumoral significativamente mayor y un mayor número de metástasis con respecto a tumores generados en animales normopeso [209].

#### **8.4 La LDLox induce la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en las células C4-2B y este efecto depende del receptor LOX-1.**

La presencia de células con capacidad de invasión es un predictor de malignidad en muchos carcinomas como el cáncer de mama y próstata. Este proceso consiste en la migración de células tumorales desde el foco inicial de origen de la neoplasia hacia tejidos circundantes, permitiendo que células tumorales penetren el endotelio vascular y se incorporen a la circulación para formar metástasis en tejidos distantes [126]. Aproximadamente el 80% del total de neoplasias son carcinomas y la ocurrencia de metástasis debida a la progresión del tumor es responsable de la mayoría de las muertes por cáncer [210]. La metástasis es un proceso que consta de varios pasos. Estos consideran la invasión local, seguida de la diseminación de células malignas al tejido subyacente, y finalmente el re-establecimiento del tumor en órganos distantes. La capacidad de las células tumorales para invadir localmente es una característica necesaria para el subsecuente desarrollo de metástasis [211].

En diferentes carcinomas el fenómeno de transición epitelio mesenquimal (EMT) favorece los procesos de invasión tumoral [212]. La EMT es un proceso complejo en que células epiteliales pierden muchas de sus características y adquieren características propias de células mesenquimales. Las características de este proceso son la pérdida de polaridad ápico-basal, la ruptura y pérdida de las uniones intercelulares, la secreción de proteasas de matriz y la reorganización del citoesqueleto que genera morfotipos celulares con capacidad migratoria e invasiva [166].

En esta tesis se analizó la respuesta del modelo celular de cáncer de próstata C4-2B en la transición epitelio mesenquimal, con expresión normal y reducida del receptor LOX-1, ante estímulos con LDLox. Además, se determinó que la LDLox a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  por 48 hrs. induce una disminución significativa en la



expresión a nivel de proteína de dos marcadores epiteliales E-cadherina y  $\gamma$ - Catenina y un aumento en la expresión del marcador mesenquimal vimentina (Fig. 25).

Además, determinamos que los tratamientos con LDLox (100  $\mu$ g/mL) durante 24 hrs. inducen una disminución significativamente en la expresión a nivel mRNA de los marcadores de epiteliales E-Cadherina y  $\gamma$ -Catenina, y aumenta significativamente la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina y N-cadherina. Interesantemente, al utilizar el modelo celular con expresión reducida de LOX-1 determinamos que los efectos de LDLox sobre la inducción de la EMT son prevenidos permitiéndonos reafirmar que LDLox a través de LOX-1 promueve una EMT en células humanas de cáncer de próstata (Fig. 24 y 25).

La efecto de la interacción de LOX-1 con su ligando LDLox en la EMT fue reportado en la línea celular de epitelio renal de rata NRK-52E [213]. Se determinó que tratamientos con concentraciones crecientes de LDLox (50  $\mu$ g/mL por 24) incrementan la expresión de LOX-1, acompañado del aumento en la expresión del marcador mesenquimal alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -sma) y una disminución del marcador epitelial E-cadherina. Sin embargo, la utilización de algunos bloqueadores químicos no específicos de LOX-1 como carragenina y Poli-I previenen los efectos inducidos por LDLox. Además, se describe que todos estos mecanismos inducidos por LDLox y LOX-1 en células NRK-52E dependen de la generación de ROS, ya que la utilización de antioxidantes como la N-acetil cisteína también previenen los efectos de LDLox [213]. Además, los tratamientos con LDLox en células musculares lisas vasculares induce la activación de la vía de  $\beta$ -catenina promoviendo la disociación del complejo E-cadherina/ $\beta$ -catenina [214].

En patologías como la aterosclerosis, diabetes tipo II, entre otras, esta descrito que la activación de LOX-1 por LDLox aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) [215]. En distintos tipos de cáncer se han observado niveles elevados de ROS lo que sugiere que es estímulo de señalización crítico que median varias funciones celulares importantes en células tumorales incluyendo tumorigénesis y metástasis [216]. Se demostró que las ROS activan la vía del factor inducible por hipoxia-1 alfa (HIF-1  $\alpha$ ) permitiendo a las células tumorales adquirir características invasivas [217, 218]. En estudios realizados en células SKOV3 de carcinoma de ovario humano, se demostró que el aumento de ROS aumenta la expresión de HIF-1  $\alpha$  y este a su vez tiene un efecto transcripcional que induce la expresión de lisil-oxidasa la cual es un represor directo del marcador epitelial E-cadherina [219]. En células con expresión reducida de HIF-1  $\alpha$  se observa que se bloquea la represión de E-cadherina, cuya reducción es un rasgo característico de las células que han pasado por una transición epitelial a mesenquimal y han aumentado su potencial tumoral invasivo [219].

En cáncer de próstata la obesidad esta asociada con tumores con estadios de *Gleason* avanzados, los cuales se caracterizan por la invasión local y metástasis. El suero de ratones alimentados con dietas hipercalóricas y con evidente alza de peso, generan un incremento en la invasión, migración y la actividad de MMP-9 en células de cáncer de próstata LNCaP. Además, en estas células los tratamientos con suero de animales obesos muestran un incremento significativo en la expresión de vimentina, una disminución en la expresión de E-cadherina y en la localización de  $\beta$ -catenina en membrana, tres eventos característicos de la EMT [142]. De igual manera, sueros de ratones *ob/ob* los cuales presentan obesidad desde la tercera semana de edad bajo condiciones de alimentación con dieta hipercalórica, inducen la expresión de los marcadores *snail* y *twist* dos factores transcripcionales asociados a EMT. Además, los

tratamientos con estos sueros incrementa la actividad de MMP-9 y disminuye la expresión de E-cadherina y el gen supresor de metástasis *kiss1* en células de melanoma humano [220] .

### **8.5 LOX-1 es determinante para el crecimiento de *xenograft* sub-cutáneos de células de cáncer de próstata C4-2B.**

Para determinar la función de LOX-1 en el crecimiento tumoral utilizamos la línea celular estable C4-2B/IRF682\_shARN, la cual presenta una disminución significativa de la expresión del receptor LOX-1. En nuestros ensayos generamos *xenografts* subcutáneos de esta línea celular en ratones *nude* y determinamos que existe una disminución significativa en el tamaño y peso tumoral en los *xenografts* de células C4-2B/IRF682\_shARN, incluso observamos que dos animales no presentaron crecimiento de esta línea celular, comparado con el crecimiento tumoral de una línea celular C4-2B/IRF682 control que fue inoculada en el mismo animal (Fig. 26).

Hirsh y colaboradores en el año 2010 describen por primera vez la sobre expresión del mRNA de LOX-1 en carcinomas mamarios y prostáticos de estadios clínico patológicos avanzados. Además, demostraron a través del análisis de perfiles transcripcionales de células epiteliales mamarias transformadas con los oncogenes *src* o *ras*/telomerasa y la comparación de perfiles transcripcionales de enfermedades del metabolismo lipídico que existen perfiles transcripcionales comunes entre los procesos carcinogénicos y los trastornos del metabolismo lipídico, evidenciando la importancia del metabolismo lipídico en los procesos de transformación celular en cáncer [160]. Específicamente se identificaron 24 nodos centrales comunes, incluyendo nodos asociados a inflamación entre los cuales destacan INF- $\gamma$ , IL-1b, IL-6, y NF-K $\beta$ ; sugiriendo además, que los procesos inflamatorios son importantes tanto en cáncer como enfermedades del metabolismo lipídico. La insulina y

el colesterol LDL también se reportaron como nodos centrales en la expresión genética relacionada al cáncer, sugiriendo la importancia de estas dos moléculas en la carcinogénicos. En este sentido se reportó que la utilización de un siARN contra LOX-1 previene el crecimiento tumoral de *xenografts* de células epiteliales mamarias MCF10-A transformadas con el oncogén src, demostrando que LOX-1 es esencial para la mantención de la transformación y crecimiento tumoral de celular en cáncer de mama [160].

Por tanto, los resultados obtenidos por Hirsh y colaboradores en conjunto con los resultados previos de nuestro laboratorio y de esta tesis nos permiten corroborar que LOX-1 es un componente determinante en la modulación del crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata, y que la aplicación de vectores recombinantes adeno-asociados son una tecnología potencialmente apropiada para proponerla como un modelo terapéutico. Sin embargo, este estudio deberá ser complementado mediante el tratamiento con vectores recombinantes adeno-asociados que medien la expresión de shARNs, una vez formado el tumor, y comparar la tasa de crecimiento e involución de los tumores versus el tratamiento con partículas virales adeno-asociadas que expresen un shARN control.

Como consideración final, en esta tesis se demostró que la activación LDLox/LOX-1 en el modelo celular de cáncer de próstata C4-2B, induce un aumento significativo de mediadores pro-angiogénicos y moléculas asociadas a migración e invasión tumoral como: VEGF, MMP-2 y MMP9, además, aumenta la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina y disminuye la expresión de marcadores epiteliales como: E-cadherina y  $\gamma$ - catenina y que el aumento esta condicionado a los niveles de expresión del receptor LOX-1, ya que en el modelo celular C4-2B con expresión reducida del receptor LOX-1 se previene la inducción de mediadores pro-angiogénicos y de marcadores mesenquimales.

Además se demostró que la expresión reducida del receptor LOX-1 mediante shARN incorporados con vectores adeno-asociados en modelos celulares de cáncer de próstata C4-2B reduce significativamente el crecimiento de *xenograft* subcutáneos de estas células tumorales en ratones inmuno-deficientes.



## 9 Conclusión

El uso de vectores adeno-asociados recombinantes que expresan shARN contra el gen OLR-1 resulta una posible estrategia terapéutica para reducir la tasa de crecimiento tumoral en cáncer de próstata.



## 10 Bibliografía

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. 2012.
3. Brinkman, M., et al., *Are men with low selenium levels at increased risk of prostate cancer?* Eur J Cancer, 2006. **42**(15): p. 2463-71.
4. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
5. Chen, F.Z. and X.K. Zhao, *Prostate Cancer: Current Treatment and Prevention Strategies*. Iran Red Crescent Med J, 2013. **15**(4): p. 279-284.
6. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
7. Chan, J.M., M. J. Stampfer, et al. (1998). "What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology." *Semin Cancer Biol* 8(4): 263-273.
8. Hsing, A.W.a.A.P.C., *Prostate cancer epidemiology*. Front Biosci 11: 1388-1413, 2006.
9. MacInnis, R.J.a.D.R.E., *Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis*. Cancer Causes Control 17(8): 989-1003, 2006.
10. Brooks, J.D., *Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia*. Campbell's Urology, 2002. **P. C. Walsh, ed. W. B. Saunders, Philadelphia** p. 41–80.
11. Maitland, N.J., *Stem Cells in the Normal and Malignant Prostate*, in *Prostate Cancer: Biochemistry, Molecular Biology and Genetics*, J.D. Tindall, Editor. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 3-41.
12. De Marzo, A.M., et al., *Inflammation in prostate carcinogenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 256-69.
13. McNeal, J.E., *The zonal anatomy of the prostate*. Prostate, 1981. **2**(1): p. 35-49.
14. Grignon, D.J., *Unusual subtypes of prostate cancer*. Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 316-27.
15. Li, J. and Z. Wang, *The pathology of unusual subtypes of prostate cancer*. Chin J Cancer Res, 2016. **28**(1): p. 130-43.
16. Tuxhorn, J.A., et al., *Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model*. Cancer Res, 2002. **62**(11): p. 3298-307.
17. Shen, M.M. and C. Abate-Shen, *Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges*. Genes Dev, 2010. **24**(18): p. 1967-2000.
18. Hagglof, C. and A. Bergh, *The stroma-a key regulator in prostate function and malignancy*. Cancers (Basel), 2012. **4**(2): p. 531-48.
19. Ao, M., et al., *Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium*. Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4244-53.
20. Vindrieux, D., P. Escobar, and G. Lazennec, *Emerging roles of chemokines in prostate cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(3): p. 663-73.
21. Putzi, M.J. and A.M. De Marzo, *Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*. Urology, 2000. **56**(5): p. 828-832.
22. Edge, S.B., D.R.; Compton, C.C.; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. (2010). "American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 7th edn." Springer.

23. Bubendorf, L., et al., *Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients*. Hum Pathol, 2000. **31**(5): p. 578-83.
24. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 292-306.
25. D'Amico, A.V., et al., *Cancer-specific mortality after surgery or radiation for patients with clinically localized prostate cancer managed during the prostate-specific antigen era*. J Clin Oncol, 2003. **21**(11): p. 2163-72.
26. Fraser, M., et al., *Chapter 14 - Prostate Cancer Genomics as a Driver of Personalized Medicine A2 - Dellaire, Graham*, in *Cancer Genomics*, J.N. Berman and R.J. Arceci, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 233-245.
27. Mukherji, D., A. Eichholz, and J.S. De Bono, *Management of metastatic castration-resistant prostate cancer: recent advances*. Drugs, 2012. **72**(8): p. 1011-28.
28. Dearnaley, D.P., et al., *Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial*. Lancet, 1999. **353**(9149): p. 267-72.
29. Potters, L., et al., *Potency after permanent prostate brachytherapy for localized prostate cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **50**(5): p. 1235-42.
30. Sarosdy, M.F., *Urinary and rectal complications of contemporary permanent transperineal brachytherapy for prostate carcinoma with or without external beam radiation therapy*. Cancer, 2004. **101**(4): p. 754-60.
31. Gillessen, S., et al., *Management of patients with advanced prostate cancer: recommendations of the St Gallen Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC) 2015*. Ann Oncol, 2015. **26**(8): p. 1589-604.
32. Tse, B.W., et al., *From Bench to Bedside: Immunotherapy for Prostate Cancer*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 981434.
33. Twiddy, A.L., C.G. Leon, and K.M. Wasan, *Cholesterol as a potential target for castration-resistant prostate cancer*. Pharm Res, 2011. **28**(3): p. 423-37.
34. Grech, A., J. Breck, and J. Heidelbaugh, *Adverse effects of testosterone replacement therapy: an update on the evidence and controversy*. Ther Adv Drug Saf, 2014. **5**(5): p. 190-200.
35. Davies, N.M., et al., *The effects of height and BMI on prostate cancer incidence and mortality: a Mendelian randomization study in 20,848 cases and 20,214 controls from the PRACTICAL consortium*. Cancer Causes Control, 2015. **26**(11): p. 1603-16.
36. Anderson, W.F., *Human gene therapy*. Science, 1992. **256**(5058): p. 808-13.
37. Miller, A.D., *Human gene therapy comes of age*. Nature, 1992. **357**(6378): p. 455-60.
38. Szybalska, E.H. and W. Szybalski, *Genetics of human cress line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 2026-34.
39. *The Journal of Gene Medicine*, John Wiley and Sons, Ltd: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical> 2014.
40. Mountain, A., *Gene therapy: the first decade*. Trends Biotechnol, 2000. **18**(3): p. 119-28.
41. Somia, N. and I.M. Verma, *Gene therapy: trials and tribulations*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(2): p. 91-9.
42. Walther, W. and U. Stein, *Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases*. Drugs, 2000. **60**(2): p. 249-71.
43. Chernajovsky, Y., D.J. Gould, and O.L. Podhajcer, *Gene therapy for autoimmune diseases: quo vadis?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 800-11.



44. Su, C.H., et al., *Nonviral gene therapy targeting cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(6): p. H629-38.
45. Jooss, K. and N. Chirmule, *Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy*. Gene Ther, 2003. **10**(11): p. 955-63.
46. Luo, J., et al., *Adeno-associated virus-mediated cancer gene therapy: current status*. Cancer Lett, 2015. **356**(2 Pt B): p. 347-56.
47. Nieto, K. and A. Salvetti, *AAV Vectors Vaccines Against Infectious Diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 5.
48. Petrs-Silva, H. and R. Linden, *Advances in recombinant adeno-associated viral vectors for gene delivery*. Curr Gene Ther, 2013. **13**(5): p. 335-45.
49. Atchison, R.W., B.C. Casto, and W.M. Hammon, *Adenovirus-Associated Defective Virus Particles*. Science, 1965. **149**(3685): p. 754-6.
50. Choi, V.W., D.M. McCarty, and R.J. Samulski, *AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(3): p. 299-310.
51. Anderson, R.J., et al., *Detection of adeno-associated virus type 2 in sorted human bone marrow progenitor cells*. Exp Hematol, 1997. **25**(3): p. 256-62.
52. Berns, K.I., *Parvovirus replication*. Microbiol Rev, 1990. **54**(3): p. 316-29.
53. Weitzman, M.D., et al., *Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 5808-12.
54. Kotterman, M.A. and D.V. Schaffer, *Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(7): p. 445-51.
55. Wu, P., et al., *Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8635-47.
56. Skubis-Zegadlo, J., A. Stachurska, and M. Malecki, *Vectrology of adeno-associated viruses (AAV)*. Med Wieku Rozwoj, 2013. **17**(3): p. 202-6.
57. Merten, O.W., C. Geny-Fiamma, and A.M. Douar, *Current issues in adeno-associated viral vector production*. Gene Ther, 2005. **12 Suppl 1**: p. S51-61.
58. Russell, D.W. and M.A. Kay, *Adeno-associated virus vectors and hematology*. Blood, 1999. **94**(3): p. 864-74.
59. Summerford, C., J.S. Bartlett, and R.J. Samulski, *AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection*. Nat Med, 1999. **5**(1): p. 78-82.
60. Summerford, C. and R.J. Samulski, *Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1438-45.
61. Xiao, P.J. and R.J. Samulski, *Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network*. J Virol, 2012. **86**(19): p. 10462-73.
62. Ding, W., et al., *rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion*. Mol Ther, 2006. **13**(4): p. 671-82.
63. Samulski, R.J., et al., *Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19*. EMBO J, 1991. **10**(12): p. 3941-50.
64. Kotin, R.M., R.M. Linden, and K.I. Berns, *Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination*. EMBO J, 1992. **11**(13): p. 5071-8.
65. Nahreini, P., S.H. Larsen, and A. Srivastava, *Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome*. Gene, 1992. **119**(2): p. 265-72.

66. Bohenzky, R.A., R.B. LeFebvre, and K.I. Berns, *Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat*. *Virology*, 1988. **166**(2): p. 316-27.
67. Yang, J., et al., *Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination*. *J Virol*, 1999. **73**(11): p. 9468-77.
68. Paneda, A., et al., *Effect of adeno-associated virus serotype and genomic structure on liver transduction and biodistribution in mice of both genders*. *Hum Gene Ther*, 2009. **20**(8): p. 908-17.
69. Jiang, H., et al., *Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B*. *Mol Ther*, 2006. **14**(3): p. 452-5.
70. Mao, H., et al., *AAV delivery of wild-type rhodopsin preserves retinal function in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa*. *Hum Gene Ther*, 2011. **22**(5): p. 567-75.
71. Kotin, R.M., *Large-scale recombinant adeno-associated virus production*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(R1): p. R2-6.
72. Mezzina, M. and O.W. Merten, *Adeno-associated viruses*. *Methods Mol Biol*, 2011. **737**: p. 211-34.
73. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, 1977. **36**(1): p. 59-74.
74. Grimm, D., et al., *Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors*. *Hum Gene Ther*, 1998. **9**(18): p. 2745-60.
75. Shin, J.H., Y. Yue, and D. Duan, *Recombinant adeno-associated viral vector production and purification*. *Methods Mol Biol*, 2012. **798**: p. 267-84.
76. Zhou, X. and N. Muzyczka, *In vitro packaging of adeno-associated virus DNA*. *J Virol*, 1998. **72**(4): p. 3241-7.
77. Hermens, W.T., et al., *Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(11): p. 1885-91.
78. Zolotukhin, S., et al., *Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield*. *Gene Ther*, 1999. **6**(6): p. 973-85.
79. Okada, T., et al., *Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes*. *Hum Gene Ther*, 2009. **20**(9): p. 1013-21.
80. Duffy, A.M., et al., *Purification of adenovirus and adeno-associated virus: comparison of novel membrane-based technology to conventional techniques*. *Gene Ther*, 2005. **12 Suppl 1**: p. S62-72.
81. Kojima, Y., et al., *Oncolytic gene therapy combined with double suicide genes for human bile duct cancer in nude mouse models*. *J Surg Res*, 2009. **157**(1): p. e63-70.
82. Mahadevan, M., et al., *Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus*. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. **56**(10): p. 1615-24.
83. Xie, Y., et al., *AAV-mediated persistent bevacizumab therapy suppresses tumor growth of ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2014. **135**(2): p. 325-32.
84. Moore, C.B., et al., *Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown*. *Methods Mol Biol*, 2010. **629**: p. 141-58.

85. Lambeth, L.S. and C.A. Smith, *Short Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing*, in *siRNA Design: Methods and Protocols*, D.J. Taxman, Editor. 2013, Humana Press: Totowa, NJ. p. 205-232.
86. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
87. Wang, Z., et al., *RNA Interference and Cancer Therapy*. Pharmaceutical Research, 2011. **28**(12): p. 2983-2995.
88. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
89. Wang, Z., et al., *RNA interference and cancer therapy*. Pharm Res, 2011. **28**(12): p. 2983-95.
90. Yu, J.Y., S.L. DeRuijter, and D.L. Turner, *RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6047-52.
91. Rao, D.D., et al., *Enhanced target gene knockdown by a bifunctional shRNA: a novel approach of RNA interference*. Cancer Gene Ther, 2010. **17**(11): p. 780-91.
92. Xia, H., et al., *siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(10): p. 1006-10.
93. Sun, A., et al., *Adeno-associated virus-delivered short hairpin-structured RNA for androgen receptor gene silencing induces tumor eradication of prostate cancer xenografts in nude mice: a preclinical study*. Int J Cancer, 2010. **126**(3): p. 764-74.
94. Pischon, T., U. Nothlings, et al., *Obesity and cancer*. Proc Nutr Soc 67(2): 128-145., 2008.
95. Montgomery, R.B., et al., *Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4447-54.
96. Pelton, K., M.R. Freeman, and K.R. Solomon, *Cholesterol and prostate cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2012. **12**(6): p. 751-9.
97. Chen, Y. and M. Hughes-Fulford, *Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2*. Int J Cancer, 2001. **91**(1): p. 41-5.
98. Kraemer, F.B., et al., *The LDL receptor is not necessary for acute adrenal steroidogenesis in mouse adrenocortical cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(2): p. E408-12.
99. Chandran, U.R., et al., *Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 64.
100. Sawamura, T., et al., *An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein*. Nature, 1997. **386**(6620): p. 73-7.
101. Twigg, M.W., et al., *The LOX-1 Scavenger Receptor and Its Implications in the Treatment of Vascular Disease*. Cardiol Res Pract, 2012. **2012**: p. 632408.
102. Chen, M., T. Masaki, and T. Sawamura, *LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis*. Pharmacol Ther, 2002. **95**(1): p. 89-100.
103. Chen, M., et al., *Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein*. FEBS Lett, 2001. **499**(3): p. 215-9.

104. Kataoka, H., et al., *Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding.* J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6573-9.
105. Chen, X.P., T.T. Zhang, and G.H. Du, *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, a new promising target for the therapy of atherosclerosis?* Cardiovasc Drug Rev, 2007. **25**(2): p. 146-61.
106. Shi, X., et al., *Characterization of residues and sequences of the carbohydrate recognition domain required for cell surface localization and ligand binding of human lectin-like oxidized LDL receptor.* J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 7): p. 1273-82.
107. Xie, Q., et al., *Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells.* DNA Cell Biol, 2004. **23**(2): p. 111-7.
108. Chen, M. and T. Sawamura, *Essential role of cytoplasmic sequences for cell-surface sorting of the lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1).* J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(3): p. 553-61.
109. Matsunaga, S., et al., *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) functions as an oligomer and oligomerization is dependent on receptor density.* Exp Cell Res, 2007. **313**(6): p. 1203-14.
110. Ohki, I., et al., *Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL.* Structure, 2005. **13**(6): p. 905-17.
111. Marsche, G., et al., *Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells.* FASEB J, 2001. **15**(6): p. 1095-7.
112. Oka, K., et al., *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9535-40.
113. Moriwaki, H., et al., *Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(10): p. 1541-7.
114. Li, D. and J.L. Mehta, *Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells.* Circulation, 2000. **101**(25): p. 2889-95.
115. Kume, N., M.I. Cybulsky, and M.A. Gimbrone, Jr., *Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells.* J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1138-44.
116. Aoyama, T., et al., *Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells.* J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(12): p. 2101-14.
117. Moriwaki, H., et al., *Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-alpha.* FEBS Lett, 1998. **440**(1-2): p. 29-32.
118. Mehta, J.L., et al., *Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells.* Cardiovasc Res, 2004. **64**(2): p. 243-9.
119. Li, D., et al., *LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(5): p. 816-21.
120. Sugimoto, K., et al., *LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells.* Cardiovasc Res, 2009. **84**(1): p. 127-36.



121. Hu, C., et al., *Regulation of TGFbeta1-mediated collagen formation by LOX-1: studies based on forced overexpression of TGFbeta1 in wild-type and lox-1 knock-out mouse cardiac fibroblasts*. J Biol Chem, 2008. **283**(16): p. 10226-31.
122. Chen, H., D. Li, and J.L. Mehta, *Modulation of matrix metalloproteinase-1, its tissue inhibitor, and nuclear factor-kappa B by losartan in hypercholesterolemic rabbits*. J Cardiovasc Pharmacol, 2002. **39**(3): p. 332-9.
123. De Craene, B. and G. Berx, *Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 97-110.
124. Tomić, T.T., et al., *Castration resistant prostate cancer is associated with increased blood vessel stabilization and elevated levels of VEGF and Ang-2*. The Prostate, 2012. **72**(7): p. 705-712.
125. Siclari, V.A., T.A. Guise, and J.M. Chirgwin, *Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 621-33.
126. Guarino, M., B. Rubino, and G. Ballabio, *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*. Pathology, 2007. **39**(3): p. 305-18.
127. Yancopoulos, G., Davis N., Gale S., Rudge J., Wiegand S. & Holash J., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. NATURE 2000. **407**: p. 242-248.
128. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-37.
129. Ribatti, D., *Cancer stem cells and tumor angiogenesis*. Cancer Lett, 2012. **321**(1): p. 13-7.
130. Moserle, L. and O. Casanovas, *Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance*. J Intern Med, 2013. **273**(2): p. 128-37.
131. Kapoor, P. and R. Deshmukh, *VEGF: A critical driver for angiogenesis and subsequent tumor growth: An IHC study*. J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(3): p. 330-7.
132. Maulik, N. and D.K. Das, *Redox signaling in vascular angiogenesis*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(8): p. 1047-60.
133. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 333-9.
134. Tepass, U., et al., *Cadherins in embryonic and neural morphogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 91-100.
135. Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 6958-69.
136. Moreno-Bueno, G., et al., *The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition*. Nat Protoc, 2009. **4**(11): p. 1591-613.
137. Maruta, H., et al., *G proteins, phosphoinositides, and actin-cytoskeleton in the control of cancer growth*. Microsc Res Tech, 1999. **47**(1): p. 61-6.
138. Gupta, G.P. and J. Massague, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. **127**(4): p. 679-95.
139. Liang, X., *EMT: new signals from the invasive front*. Oral Oncol, 2011. **47**(8): p. 686-7.
140. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 374-83.
141. Polyak, K. and R.A. Weinberg, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 265-73.

142. Price, R.S., et al., *Obesity-related systemic factors promote an invasive phenotype in prostate cancer cells*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2012. **15**(2): p. 135-43.
143. Gonzalez-Chavarria, I., et al., *Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is an enhancer of tumor angiogenesis in human prostate cancer cells*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e106219.
144. Bray, F. and B. Moller, *Predicting the future burden of cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 63-74.
145. Lu, J., et al., *Oxidative stress and lectin-like ox-LDL-receptor LOX-1 in atherogenesis and tumorigenesis*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(8): p. 2301-33.
146. Hsu, I.R., et al., *Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and cancer*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(3): p. s867-71.
147. Pischon, T., U. Nothlings, and H. Boeing, *Obesity and cancer*. Proc Nutr Soc, 2008. **67**(2): p. 128-45.
148. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
149. Fuemmeler, B.F., M.K. Pendzich, and K.P. Tercyak, *Weight, dietary behavior, and physical activity in childhood and adolescence: implications for adult cancer risk*. Obes Facts, 2009. **2**(3): p. 179-86.
150. LeRoith, D., et al., *Obesity and type 2 diabetes are associated with an increased risk of developing cancer and a worse prognosis; epidemiological and mechanistic evidence*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2008. **116 Suppl 1**: p. S4-6.
151. Hirsch, H.A., et al., *Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7507-11.
152. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
153. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
154. Van Waes, C., *Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1076-82.
155. Chen, X., et al., *The reciprocal relationship between adiponectin and LOX-1 in the regulation of endothelial dysfunction in ApoE knockout mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(3): p. H605-12.
156. Mehta, J.L., et al., *Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(1): p. 36-45.
157. Taye, A. and A.A. El-Sheikh, *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 pathways*. Eur J Clin Invest, 2013. **43**(7): p. 740-5.
158. Aggarwal, B.B., et al., *Inflammation and cancer: how hot is the link?* Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1605-21.
159. Khaidakov, M., et al., *Oxidized LDL receptor 1 (OLR1) as a possible link between obesity, dyslipidemia and cancer*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20277.
160. Hirsch, H.A., et al., *A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases*. Cancer Cell, 2010. **17**(4): p. 348-61.
161. Lamperti, L., *Expresión y función del receptor LOX-1 en células humanas normales y tumorales*. 2009, Universidad de Concepción.

162. Gonzalez- Chavarría, I., *El receptor LOX-1 induce una transición epitelio-mesenquimal en células de cáncer de próstata DU-145*. . 2010, Universidad de Concepción.
163. Chapman, M.J., et al., *A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum*. J Lipid Res, 1981. **22**(2): p. 339-58.
164. Li, W.W., et al., *Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention*. J Oncol, 2012. **2012**: p. 879623.
165. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
166. Selgas, R., et al., *[Epithelial-mesenchymal transition in fibrosing processes. Mesothelial cells obtained ex vivo from patients treated with peritoneal dialysis as transdifferentiation model]*. Nefrologia, 2004. **24**(1): p. 34-9.
167. Li, J., et al., *Adenovirus-Mediated Angiotensin II Type 2 Receptor Overexpression Inhibits Tumor Growth of Prostate Cancer In Vivo*. J Cancer, 2016. **7**(2): p. 184-91.
168. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update*. J Gene Med, 2013. **15**(2): p. 65-77.
169. Ledford, H., *Cancer-fighting viruses win approval*. Nature, 2015. **526**(7575): p. 622-3.
170. Yamanaka, S., et al., *The human gene encoding the lectin-type oxidized LDL receptor (OLR1) is a novel member of the natural killer gene complex with a unique expression profile*. Genomics, 1998. **54**(2): p. 191-9.
171. Ando, K. and T. Fujita, *Role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in the development of hypertensive organ damage*. Clin Exp Nephrol, 2004. **8**(3): p. 178-82.
172. Bai, J., et al., *Sleeve gastrectomy prevents lipoprotein receptor-1 expression in aortas of obese rats*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(32): p. 3739-44.
173. Dominguez, J.H., et al., *Anti-LOX-1 therapy in rats with diabetes and dyslipidemia: ablation of renal vascular and epithelial manifestations*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(1): p. F110-9.
174. Fukui, M., et al., *LOX-1 is a novel marker for peripheral artery disease in patients with type 2 diabetes*. Metabolism, 2013. **62**(7): p. 935-8.
175. Tatsuguchi, M., et al., *Oxidized LDL receptor gene (OLR1) is associated with the risk of myocardial infarction*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(1): p. 247-50.
176. White, S.J., G.B. Sala-Newby, and A.C. Newby, *Overexpression of scavenger receptor LOX-1 in endothelial cells promotes atherogenesis in the ApoE(-/-) mouse model*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(6): p. 369-73.
177. Chen, M., et al., *Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of LOX-1 ligand and AGE*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(4): p. 962-8.
178. Wang, D.D., et al., *Comparison analysis in synchronous and metachronous metastatic colorectal cancer based on microarray expression profile*. Hepatogastroenterology, 2014. **61**(136): p. 2215-8.
179. Jiang, L., et al., *Combination of body mass index and oxidized low density lipoprotein receptor 1 in prognosis prediction of patients with squamous non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(26): p. 22072-80.
180. Pasini, F.S., et al., *A gene expression profile related to immune dampening in the tumor microenvironment is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma*. J Gastroenterol, 2014. **49**(11): p. 1453-66.

181. Santiago-Ortiz, J.L. and D.V. Schaffer, *Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy*. J Control Release, 2016. **240**: p. 287-301.
182. Kelesidis, I., T. Kelesidis, and C.S. Mantzoros, *Adiponectin and cancer: a systematic review*. Br J Cancer, 2006. **94**(9): p. 1221-5.
183. Calle, E.E. and M.J. Thun, *Obesity and cancer*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6365-78.
184. Khaidakov, M. and J.L. Mehta, *Oxidized LDL triggers pro-oncogenic signaling in human breast mammary epithelial cells partly via stimulation of MiR-21*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46973.
185. De Giuseppe, R., et al., *Correlation between salivary and serum oxidized LDL levels: a pilot study on overweight/obese subjects*. J Oral Pathol Med, 2015. **44**(10): p. 884-7.
186. Bausenwein, J., et al., *Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and of catalase activity in follicular fluid of obese women*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(2): p. 117-24.
187. Couillard, C., et al., *Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(12): p. 6454-9.
188. Tong, Y.-C., *The role of cholesterol in prostatic diseases*. Urological Science, 2011. **22**(3): p. 97-102.
189. Wan, F., et al., *Oxidized low-density lipoprotein is associated with advanced-stage prostate cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(5): p. 3573-82.
190. Aoyama, T., et al., *LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells*. FEBS Lett, 2000. **467**(2-3): p. 217-20.
191. Fernández, L.I.L., *Expresión y función del receptor LOX-1 en células humanas normales y tumorales*, in *Doctorado en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular*. 2009, Universidad De Concepción: Chile.
192. Li, D. and J.L. Mehta, *Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 1116-22.
193. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1359-70.
194. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
195. Baeriswyl, V.a.G.C., *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-337.
196. Fukumura, D., et al., *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. Cell, 1998. **94**(6): p. 715-25.
197. Garbin, U., et al., *Effects of nebivolol on endothelial gene expression during oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells*. Mediators Inflamm, 2008. **2008**: p. 367590.
198. Dandapat, A., et al., *Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2435-42.
199. Hu, C., A. Dandapat, and J.L. Mehta, *Angiotensin II induces capillary formation from endothelial cells via the LOX-1 dependent redox-sensitive pathway*. Hypertension, 2007. **50**(5): p. 952-7.
200. Kanata, S., et al., *Oxidized LDL binding to LOX-1 upregulates VEGF expression in cultured bovine chondrocytes through activation of PPAR-gamma*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(3): p. 1003-10.



201. Hijova, E., *Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications*. Bratisl Lek Listy, 2005. **106**(3): p. 127-32.
202. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 737-44.
203. Grunstein, J., et al., *Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function*. Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1592-8.
204. Fang, J., et al., *Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 3884-9.
205. Arbiser, J.L., et al., *Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 715-20.
206. Jiang, J., et al., *Angiogenesis is a link between atherosclerosis and tumorigenesis: role of LOX-1*. Cardiovasc Drugs Ther, 2011. **25**(5): p. 461-8.
207. Khaidakov, M., et al., *Antiangiogenic and antimetabolic effects of aspirin in hypoxia-reoxygenation modulation of the LOX-1-NADPH oxidase axis as a potential mechanism*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **56**(6): p. 635-41.
208. Van den Steen, P.E., et al., *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002. **37**(6): p. 375-536.
209. Llaverias, G., et al., *A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer*. Am J Pathol, 2010. **177**(6): p. 3180-91.
210. KUMAR, A.A., in *Patologia Humana de Robbins, Capítulo 6, Neoplasias*, Elsevier, Editor. 2010.
211. Mareel, M. and A. Leroy, *Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion*. Physiol Rev, 2003. **83**(2): p. 337-76.
212. Voulgari, A. and A. Pintzas, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(2): p. 75-90.
213. Wang, R., et al., *Role of LOX-1 and ROS in oxidized low-density lipoprotein induced epithelial-mesenchymal transition of NRK52E*. Lipids Health Dis, 2010. **9**: p. 120.
214. Bedel, A., et al., *E-cadherin/beta-catenin/T-cell factor pathway is involved in smooth muscle cell proliferation elicited by oxidized low-density lipoprotein*. Circ Res, 2008. **103**(7): p. 694-701.
215. Lubrano, V. and S. Balzan, *LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage*. Free Radic Res, 2014. **48**(8): p. 841-8.
216. Galanis, A., et al., *Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer*. Cancer Lett, 2008. **266**(1): p. 12-20.
217. Kirschmann, D.A., et al., *A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4478-83.
218. Yoon, S.O., et al., *Sustained production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 30271-82.
219. Wang, Y., et al., *Reactive oxygen species promote ovarian cancer progression via the HIF-1alpha/LOX/E-cadherin pathway*. Oncol Rep, 2014. **32**(5): p. 2150-8.
220. Kushiro, K. and N.P. Nunez, *Ob/ob serum promotes a mesenchymal cell phenotype in B16BL6 melanoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2011. **28**(8): p. 877-86.