



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Magíster en Biotecnología Molecular

**“EFECTO DE DIHIDROMIRICETINA Y QUERCETINA EN LA
PREVENCIÓN DE LA RESISTENCIA A ENZALUTAMIDA INDUCIDA POR
LOX-1/OXLDL EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE
A CASTRACIÓN”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Biotecnología Molecular

FÉLIX DAVID DUPRAT DUPRAT

CONCEPCIÓN-CHILE

2021

Profesor Guía: Dr. IVÁN ANTONIO GONZÁLEZ CHAVARRÍA

Laboratorio de Lipoproteínas y Cáncer

Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas,

Universidad de Concepción

Profesor Co-guía: Dr. CRISTIAN FABIAN PAZ ROBLES

Laboratorio de Productos Naturales y Descubrimiento de Fármacos

Departamento de Ciencias Básicas

Universidad de La Frontera



No hay nada imposible. No importa lo lejano que parezca, si sigues las reglas, llegarás al 10.000 millones por ciento. Así funciona la ciencia.

Ishigami Senku.

AGRADECIMIENTOS

Dentro de las personas a las que quiero agradecer, primero está mi familia, mis abuelos, tíos y mi mamá, quienes fueron el principal sostén en esta aventura que significó dejar el nido, a pesar de la distancia y el tiempo sin poder vernos (especialmente en tiempos de pandemia), siempre estuvieron de alguna forma, apoyando y ayudando a que pudiera terminar esta etapa.

También agradecer a mi tutor, el profesor Iván, por la confianza y el apoyo entregado durante la realización del magíster. También a mi cotutor, el profesor Cristian, quien me motivó a estudiar durante el tiempo en que trabajé con él.

Nuevamente agradecer a mi tío, por el apoyo que me brindó recibíendome en su casa durante mi primer año de estadía acá en Concepción.

A todos los chicos del laboratorio, que siempre me ayudaron cuando tenía alguna duda y me enseñaron muchas cosas importantes para el trabajo en el laboratorio, tanto prácticas como teóricas desde que llegué hasta estos días.

A mis amigos de toda la vida, los manyones y manyonas que siempre que volvía a casa tenían un panorama (culinario o de paseo), demostrando que a pesar de la distancia las buenas (y malas) costumbres no se pierden.

A los cabros del discord de GS, que cuando las cosas estuvieron difíciles por los acontecimientos de pandemia, fueron un pilar importante, logrando que las risas no faltaran y los compañeros para jugar tampoco. Destacar también al Sebitian y el Oku que me ayudaron en todo lo que tenía que ver con el computador cuando tenía problemas y con la salida al aire de las Elfoaventuras.

Como no agradecer a la Paula y la Pauli que me tuvieron y tienen que soportar en los momentos que ya no quiero más guerra y los chistes fomes, a la Monse que, aunque se fue antes, también tuvo que aguantarme un tiempo. Al Leo y al Brian que pasaban al departamento y hacían que las risas no faltaran, al igual que el Turbo.

No puedo dejar sin nombrar al tío Saitama y la tía Pam que fueron parte de la compañía en las noches de escritura, al igual que los chiquillos de discord cuando se las daban de DJ.



ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
1. RESUMEN	vi
2. ABSTRACT	ix
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1. Contexto general del cáncer de próstata	1
3.2. Cáncer de próstata resistente a castración con resistencia a enzalutamida	5
3.3. LOX-1 y LDL oxidada, su función en cáncer.....	8
3.4. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, rol fisiológico y fisiopatológico.....	12
3.5. Metabolitos secundarios, flavonoides y su actividad antioxidante ..	14
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	20
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS	21
6.1. Objetivo General:.....	21
6.2. Objetivos Específicos:.....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1. Generación líneas celulares con silenciamiento de LOX-1.....	22
7.2. Transfección de células para análisis de actividad p65 asociado a reportero luciferasa.....	22
7.3. Determinación del efecto de oxLDL y LOX-1 en la generación de ROS en células C4-2B.	23
7.4. Determinación del efecto de oxLDL y LOX-1 en la activación de NF- κ B en células con C4-2B, a través de western blot.	24
7.5. Determinación del efecto de oxLDL y LOX-1 en la activación de NF- κ B en células con C4-2B, a través del análisis de actividad p65 asociado a reportero luciferasa.....	25
7.6. Efecto de LOX-1/oxLDL sobre la citotoxicidad de enzalutamida.....	25
7.7. Determinación del efecto de LOX-1 en la expresión de marcadores de resistencia a enzalutamida en células de cáncer de próstata.....	26

7.8.	Extracción y purificación de dihidromiricetina y quercetina a partir de <i>Maytenus disticha</i>	26
7.9.	Efecto de dihidromiricetina y quercetina en la activación de la vía NF- κ B inducida por oxLDL.....	27
7.10.	Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la expresión de marcadores de resistencia docetaxel inducida por oxLDL.....	27
7.11.	Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la citotoxicidad de enzalutamida en células tratadas con oxLDL.	28
8.	RESULTADOS	29
8.1.	Silenciamiento de LOX-1 con ARN de interferencia.	29
8.2.	LOX-1/oxLDL promueve la generación de ROS en células CRPC.	31
8.3.	LOX-1/oxLDL promueve la activación de NF- κ B en células C4-2B.	33
8.4.	LOX-1/oxLDL promueve la expresión de marcadores de resistencia, receptor de andrógenos (AR) y receptor de andrógenos variante 7(AR-V7). 37	
8.5.	Efecto de oxLDL sobre la citotoxicidad de enzalutamida.....	40
8.6.	Purificación de dihidromiricetina y quercetina desde <i>Maytenus disticha</i>	42
8.7.	Efecto de <i>Maytenus disticha</i> , dihidromiricetina y quercetina sobre la generación de ROS inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B.....	44
8.8.	Efecto de <i>Maytenus disticha</i> , dihidromiricetina y quercetina sobre la activación de NF- κ B inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B.	46
8.9.	Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la expresión de AR y AR-V7 inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B.....	50
8.10.	Quercetina y no dihidromiricetina previenen los efectos de LOX-1/oxLDL en la citotoxicidad de enzalutamida en células C4-2B.	53
9.	DISCUSIÓN	55
9.1.	Silenciamiento de LOX-1 con ARN de interferencia como una herramienta para la función de LOX-1 en el estudio de cáncer de próstata resistente a castración.....	56
9.2.	LOX-1/oxLDL promueve la generación de ROS en células CRPC.	57
9.3.	LOX-1/oxLDL promueve la activación de NF- κ B en células C4-2B.	59
9.4.	LOX-1/oxLDL promueve la expresión de marcadores de resistencia, receptor de andrógenos (AR) y receptor de andrógenos variante 7(AR-V7) y efecto de LOX-1/oxLDL sobre la citotoxicidad de enzalutamida.....	61
9.5.	Purificación de dihidromiricetina y quercetina.....	64

9.6. Efecto de <i>Maytenus disticha</i> , dihidromiricetina y quercetina sobre la generación de ROS inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B.....	65
9.7. Efecto de <i>Maytenus disticha</i> , dihidromiricetina y quercetina sobre la activación 10de NF-κB inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B	68
9.8. Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la expresión de AR y AR-V7 inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B.....	71
9.9. Efecto dihidromiricetina y quercetina sobre la citotoxicidad de enzalutamida en células C4-2B tratadas con oxLDL	74
10. CONCLUSIONES.....	75
11. GLOSARIO.....	77
12. REFERENCIAS.....	79



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Conformación de las diferentes variantes de splicing de AR.	7
Figura 2: Esquema estructural de AR	8
Figura 3: Receptor de LDL oxidada LOX-1	10
Figura 4: Maytenus disticha	17
Figura 5: Estructura química de dihidromiricetina.	18
Figura 6: Estructura química de quercetina.	19
Figura 7: Expresión de LOX-1 en células C4-2B transfectadas con ARN de interferencia por 48 horas.	30
Figura 8: Análisis generación de ROS en células C4-2B transfectadas con ARN de interferencia contra LOX-1, estimuladas con oxLDL por 180 minutos.	32
Figura 9: Expresión de I κ B fosforilado en células C4-2B siARN control y C4-2B con ARN de interferencia contra LOX-1 con y sin oxLDL, 60 minutos post tratamiento con oxLDL.	34
Figura 10: Expresión de NF- κ B subunidad p65 en células C4-2B y C4-2B con ARN de interferencia contra LOX-1 con y sin oxLDL, 60 minutos post tratamiento con oxLDL.	35
Figura 11: Activación de la vía NF- κ B en células C4-2B y C4-2B con ARN de interferencia contra LOX-1 mediante actividad luciferasa.	36
Figura 12: Expresión de receptor de andrógenos (AR) en células C4-2B con LOX-1 silenciado.	38
Figura 13: Expresión de receptor de andrógenos variante 7 (AR-V7) en células C4-2B con LOX-1 silenciado.	39
Figura 14: Efecto de oxLDL 50 μ g/mL en la citotoxicidad de enzalutamida en dosis de 20 μ M en células C4-2B con siARN control y siARN contra LOX-1.	41
Figura 15: RMN H1 de dihidromiricetina obtenida a partir de M. disticha. ...	43
Figura 16: RMN H1 de quercetina obtenida a partir de M. disticha.	43

Figura 17: Análisis generación de ROS en células C4-2B, tratadas con Extracto total de <i>M. disticha</i> , dihidromiricetina, quercetina y trolox, estimuladas con oxLDL por 180 minutos.	45
Figura 18: Expresión de IκB fosforilados en células C4-2B tratadas con 50 μg/mL de oxLDL por 1 hora, junto con extracto total de <i>M. disticha</i> , quercetina y dihidromiricetina.	48
Figura 19: Expresión de p-NF-κB p65 en células C4-2B tratadas con 50 μg/mL de oxLDL por 1 hora, en co-tratamiento con extracto total de <i>M. disticha</i> , quercetina y dihidromiricetina.	49
Figura 20: Expresión de AR en células C4-2B tratadas con 50 μg/mL de oxLDL por 24 horas, junto con extracto total de <i>M. disticha</i> , quercetina, dihidromiricetina.	51
Figura 21: Expresión de AR-V7 en células C4-2B tratadas con 50 μg/mL de oxLDL por 24 horas, junto con extracto total de <i>M. disticha</i> , quercetina, dihidromiricetina.	52
Figura 22: Viabilidad de células C4-2B tratadas con 25 μM de dihidromiricetina, 50 μM de quercetina y 50 μg/mL de oxLDL por 24 horas, además de tratamiento de 20 μM de enzalutamida.	54

1. RESUMEN

El cáncer de próstata es el cáncer con mayor incidencia en varones, tanto a nivel mundial como en el país. Para su tratamiento se utiliza la terapia de deprivación de andrógenos (ADT), sin embargo, a pesar de que los pacientes responden inicialmente a ADT, un porcentaje de éstos generan resistencia a dicho tratamiento, produciendo un cáncer de próstata resistente a castración (CRPC). Para el tratamiento de CRPC uno de los fármacos utilizados es la enzalutamida, un antagonista del receptor de andrógenos, que aumenta la sobrevida del paciente y sus efectos secundarios son en su mayoría leves. A pesar de su efectividad, muchos pacientes desarrollan resistencia a enzalutamida principalmente a través de: 1) la sobreexpresión de receptor de andrógenos, y 2) la sobreexpresión de isoformas del receptor de andrógenos, como AR-V7, la cual no presenta un dominio de activación y se comporta como una variante constitutivamente activa de este receptor. La transcripción de AR y AR-V7, es regulada en parte por el factor transcripción NF- κ B, el cual puede ser activado por especies reactivas de oxígeno (ROS).

En caso de CRPC resistente a enzalutamida, se comienza un nuevo tratamiento con drogas como docetaxel y/o cabazitaxel, sin embargo, la aparición de nuevos efectos secundarios y el cambio de tratamiento puede conllevar a un deterioro en la calidad de vida del paciente. Estos antecedentes evidencian la necesidad de encontrar blancos terapéuticos que permitan prevenir el desarrollo de resistencia a enzalutamida. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que en células de cáncer de próstata CRPC, tratamientos con oxLDL generan un aumento en los

niveles de ROS, además de promover la activación de NF-κB. Por otra parte, se conocen una gran cantidad de metabolitos secundarios que tienen actividad antioxidante, en este sentido se han aislado desde *Maytenus disticha* compuestos a los que se les ha reportado tal actividad como dihidromiricetina y quercetina.

La hipótesis de la presente tesis es que los flavonoides dihidromiricetina y quercetina obtenidos desde *M. disticha* previenen el desarrollo de resistencia a enzalutamida, inducida por oxLDL a través de la prevención de la generación de ROS y la consecuente inhibición de la activación de la vía NF-κB. El objetivo general es analizar el efecto de los flavonoides dihidromiricetina y quercetina sobre la resistencia a enzalutamida inducida por LOX-1/oxLDL en líneas celulares de cáncer de próstata. Así, planteamos dos objetivos específicos, primero determinar la función de LOX-1/oxLDL en la resistencia a enzalutamida mediada por la activación de la vía NF-κB. Evaluaremos el efecto de la activación de LOX-1/oxLDL en líneas celulares de CRPC, C4-2B, sobre la activación de la vía NF-κB y la generación de resistencia a enzalutamida. Como segundo objetivo planteamos determinar el efecto de los flavonoides dihidromiricetina y quercetina en la prevención de la resistencia a enzalutamida inducida por LOX-1/oxLDL.

Se expresó de forma transiente un promotor mínimo de p65 asociado a reportero de luciferasa en línea celular C4-2B y se evaluó el efecto del silenciamiento de LOX-1 y su repercusión sobre la activación de la vía NF-κB con o sin tratamientos de oxLDL. De la misma manera, se evaluó la fosforilación de NF-κB e IκB con tratamientos con y sin oxLDL mediante western blot. Así como también los efectos de LOX-1/oxLDL en la expresión de marcadores asociados a la resistencia a enzalutamida (AR y AR-V7) y el efecto de LOX-1/oxLDL en la citotoxicidad de

enzalutamida. Para el desarrollo del segundo objetivo, se purificaron los flavonoides dihidromiricetina y quercetina desde *M. disticha* y se analizó su capacidad en la prevención de formación de ROS, activación de NF- κ B y la generación de resistencia a enzalutamida inducida por LOX-1/oxLDL.

Nuestros resultados demuestran que la activación de LOX-1 mediada por oxLDL aumenta los niveles de ROS, fosforilación de NF- κ B p65 e I κ B, expresión de AR y AR-V7, además de disminuir la citotoxicidad de enzalutamida. El extracto total de *M. disticha* previene las fosforilaciones de I κ B y NF- κ B p65, además de la expresión de AR, en cambio no presenta diferencias en la generación de ROS ni en la expresión de AR-V7 inducidos por oxLDL. Por otra parte, quercetina previene dichos aumentos provocados por LOX-1/oxLDL en células C4-2B. Dihidromiricetina en tanto, previene las fosforilaciones de NF- κ B e I κ B, pero aumenta la generación de ROS y la expresión de AR, aunque no presenta diferencias en la expresión de AR-V7. La evaluación de la citotoxicidad de enzalutamida en células tratadas con oxLDL y quercetina previno los efectos de resistencia provocados por oxLDL, en cambio dihidromiricetina no tuvo efecto alguno sobre ésta.

2. ABSTRACT

Prostate cancer is the cancer with the highest incidence in men, both worldwide and in the country. Androgen deprivation therapy (ADT) is used for its treatment, however, even though patients initially respond to ADT, a percentage of patients generate resistance to said treatment, generating castration-resistant prostate cancer (CRPC). For the treatment of CRPC, one of the drugs used is enzalutamide, an androgen receptor antagonist, which increases the survival of the patient, and its side effects are mostly mild. Despite its effectiveness, many patients develop resistance to enzalutamide mainly through 1) androgen receptor overexpression, and 2) overexpression of androgen receptor isoforms, such as AR-V7, which does not present a domain of activation and behaves as a constitutively active variant of this receptor. AR and AR-V7 transcription is regulated in part by the transcription factor NF- κ B, which can be activated by reactive oxygen species (ROS).

In the case of CRPC resistant to enzalutamide, a new treatment is started with drugs such as docetaxel, cabazitaxel, however, the appearance of new side effects and the change of treatment can lead to a deterioration in the quality of life of the patient. These antecedents show the need to find therapeutic targets that allow preventing the development of resistance to enzalutamide. Our research group has shown that in CRPC prostate cancer cells, treatments with oxLDL generate an increase in ROS levels, in addition to promoting the activation of NF- κ B. Many secondary metabolites that have antioxidant activity are known, in this sense compounds have been isolated from *Maytenus*

disticha to which such activity as dihydromyricetin and quercetin have been reported.

The hypothesis of the present thesis is that the flavonoids dihydromyricetin and quercetin obtained from *Maytenus disticha* prevent the development of resistance to enzalutamide, induced by oxLDL through the prevention of the generation of ROS and the consequent inhibition of the activation of the NF- κ B pathway. The general objective is to evaluate the effect of the flavonoids dihydromyricetin and quercetin on the resistance to enzalutamide induced by LOX-1/oxLDL in prostate cancer cell lines. Thus, we propose two specific objectives, first to determine the role of LOX-1/oxLDL in resistance to enzalutamide mediated by the activation of the NF- κ B pathway. We will evaluate the effect of LOX-1/oxLDL activation in CRPC cell lines, C4-2B, on the activation of the NF- κ B pathway and the generation of resistance to enzalutamide. As a second objective, we set out to determine the effect of the flavonoids dihydromyricetin and quercetin in the prevention of resistance to enzalutamide induced by LOX-1/oxLDL.

A luciferase reporter-associated p65 minimal promoter was transiently expressed in the C4-2B cell line and the effect of LOX-1 silencing and its impact on the activation of the NF- κ B pathway with or without oxLDL treatments was evaluated. In the same way, the phosphorylation of NF- κ B and I κ B with treatments with and without oxLDL was evaluated by western blot. As well as the effects of LOX-1 / oxLDL on the expression of markers associated with resistance to enzalutamide (AR and AR-V7) and the effect of LOX-1/oxLDL on enzalutamide cytotoxicity. The flavonoids dihydromyricetin and

quercetin were purified from *M. disticha* and analyzed for their ability to prevent ROS formation, NF- κ B activation and the generation of LOX-1/oxLDL-induced resistance to enzalutamide. Our results demonstrate that oxLDL-mediated activation of LOX-1 increases ROS levels, phosphorylation of NF- κ B p65 and I κ B, expression of AR and AR-V7, in addition to decreasing enzalutamide cytotoxicity. The total extract of *M. disticha*, prevents phosphorylations of I κ B and NF- κ B p65, in addition to the expression of AR, on the other hand, it does not present differences in the generation of ROS or in the expression of AR-V7. On the other hand, quercetin prevents such increases caused by LOX-1/oxLDL in C4-2B cells. Dihydromyricetin, meanwhile, prevents phosphorylations of NF- κ B and I κ B, but increases the generation of ROS and the expression of AR, although it does not present differences in the expression of AR-V7. The evaluation of enzalutamide cytotoxicity in cells treated with oxLDL and quercetin prevented the resistance effects caused by oxLDL, whereas dihydromyricetin had no effect on it.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Contexto general del cáncer de próstata

El cáncer es la segunda causa de muerte por enfermedad a nivel mundial, por lo cual se ha convertido en una prioridad para la salud pública en gran parte del mundo (Siegel et al., 2019). Para el 2018 cerca de 18 millones de nuevos casos fueron diagnosticados y se registraron alrededor de 10 millones de muertes por dicha patología (Bray et al., 2018). En el continente americano, según los datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), se indica que el cáncer es la primera causa de muertes prematuras, considerando un rango etario entre 30–70 años (Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud, 2019). En Chile la situación no es distinta al resto del mundo, el Ministerio de Salud (MINSAL) reporta que el cáncer es la segunda causa de muerte, provocando 143 decesos por cada 100.000 habitantes, superada solamente por las enfermedades cardiovasculares, sin embargo, existen regiones del país en las que el cáncer ya se posiciona como la patología con mayor mortalidad (entre ellas la región del Biobío). En el año 2018, del total de nuevos casos descubiertos (53.365) en hombres, aquellos con mayor incidencia fueron próstata (23,9%), estómago (12,5%) y colorrectal (10,9%); para mujeres la mayor incidencia fue en cáncer de mama (20,8%), colorrectal (11,3%) y estómago (6,7%). En cuanto a la mortalidad en el 2018, hubo 28.443 fallecidos por cáncer (GLOBOCAN, 2019) y se estima que para 2023 se posicionará como la principal causa de muerte a nivel país (Ministerio de Salud de Chile, 2018).

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más común en la población masculina tanto a nivel mundial como en Chile. Principalmente es diagnosticado en hombres mayores de 40 años y posee variados factores de riesgo como: edad, etnia, dieta, carga genética (Grönberg, 2003; Nelson & Shah, 2019), siendo este último, el más frecuente en la incidencia de este cáncer en individuos menores de 55–60 años (Grönberg, 2003), posicionando a este factor como el que más incidencia tiene en la población económicamente activa.

El programa de Garantías Explícitas en Salud (GES) incluye 14 tipos de cáncer en su cobertura, entre ellos el cáncer de próstata. Durante el año 2016 esta patología concentró al 10% de los pacientes con cáncer tratados, con un costo anual promedio de \$3.000.000 por paciente (Chile, 2017). La tasa de muerte por cáncer de próstata en el país, desde 1997 registra un alza, aunque tomando en cuenta solamente los últimos 20 años ésta se ha mantenido estable (Minsal, 2015), aunque se pronostica que de aquí a 2040 la incidencia y mortalidad de esta patología se duplicará (Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, 2020).

En el tratamiento para el cáncer de próstata de alto riesgo, se utiliza en primera instancia la terapia de deprivación de andrógenos (ADT), debido a la dependencia entre este cáncer y la señalización dependiente de andrógenos (Chandrasekar et al., 2015), sin embargo, algunas células cancerígenas pueden progresar durante la ADT, razón por la cual un porcentaje de los pacientes genera resistencia a la castración, lo que se conoce como cáncer

de próstata resistente a castración (CRPC) (Y. Huang et al., 2018). La resistencia a castración se puede generar por la sobreexpresión de los receptores de andrógenos (AR), a través de la promiscuidad de AR, el cual podría utilizar otros ligandos para su activación o incluso algunas drogas utilizadas en el tratamiento de esta patología, o a través de la generación de mutaciones que alteran la funcionalidad de AR. Dentro de las mutaciones que se han encontrado se encuentra Thr877Ala, que otorga a este receptor una mayor afinidad a esteroides estereogénicos y progestagénicos, además de darle afinidad a hidroxiflutamida, permitiendo que AR pueda ser activado mayormente por dichos compuestos (Culig et al., 1995). Además, otra de las formas que tiene para obtener andrógenos una célula CRPC, es la auto síntesis de éstos (Debes & Tindall, 2004; Y. Huang et al., 2018; Ravishankar et al., 2013). Al generarse esta resistencia a castración, la guía clínica del MINSAL recomienda para tratamiento CRPC la utilización de enzalutamida, abiraterona o docetaxel, según el estado general de salud del paciente (Minsal, 2015). Debido a la relevancia de AR, lo convierte en un blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer de próstata resistente a castración. en esta tesis nos enfocaremos en la enzalutamida como blanco terapéutico dirigido a AR y los efectos de la resistencia a esta droga.

La enzalutamida es un antiandrógeno no esteroidal conocido también como MDV3100 (Hussain et al., 2018), se administra de forma oral y ha demostrado un aumento en la supervivencia de los pacientes, lo que lo posiciona como uno de los medicamentos más utilizados en el tratamiento de cáncer de próstata metastásico. Otra de las características que lo posiciona de esta forma es que

su afinidad con AR es mayor que la de otros fármacos (Schalken & Fitzpatrick, 2016). Si bien este fármaco se comenzó utilizando en pacientes con CRPC metastásico, ha demostrado efectividad en la prevención de la metástasis en pacientes con CRPC no metastásico (Armstrong et al., 2019; Hussain et al., 2018). Su mecanismo de acción puede inhibir la señalización de la vía de AR en tres partes de ésta. La primera es bloquear la unión entre AR y su ligando, inhibe además la traslocación de AR hacia el núcleo e inhibe la unión de AR con ADN, de esta manera bloquea la transcripción de genes codificantes para proteínas necesarias para la proliferación celular (Moreira et al., 2016; Schalken & Fitzpatrick, 2016). Dentro de los efectos secundarios más comunes producidos por la administración de enzalutamida a los pacientes se encuentran fatiga, dolores de espalda, artralgia e hipertensión, estos síntomas se presentan en tal grado que pueden llegar a incapacitar al paciente en ocasiones; por otra parte, otros efectos secundarios de menor grado son, estreñimiento dolores de cabeza, pérdida de peso, entre otros (Beer et al., 2014; Moreira et al., 2016). En Chile, el presupuesto utilizado en enzalutamida el año 2018 fue de \$12.316.000.000 en el caso de pacientes que comenzaron el tratamiento y de \$2.751.000.000 en el caso de pacientes con tratamiento previo con otros fármacos. El costo por paciente llega aproximadamente a los \$19.300.000 por año, superando el umbral de costo para un tratamiento de segunda línea, según lo estipulado por el ministerio de salud (Minsal, 2015). Por lo cual se hace necesario generar la búsqueda de nuevos tratamientos o adyuvantes que ayuden a disminuir los efectos secundarios de los pacientes, o reducir los altos costos de este tipo de tratamientos.

3.2. Cáncer de próstata resistente a castración con resistencia a enzalutamida

Los tratamientos con enzalutamida son prolongados, y en los pacientes su efectividad puede variar a lo largo de éste. Es dentro de este contexto, que, si bien la terapia con dicho fármaco en pacientes con CRPC tiene efectos positivos en un alto porcentaje de los pacientes, algunos pacientes pueden presentar resistencia temprana (intrínseca) a este fármaco dentro de los primeros 3 meses (Caffo et al., 2016; Tagawa et al., 2019), o tardía (adquirida) posterior a 18 meses, lo cual refleja que un gran número de pacientes desarrolla resistencia a esta droga, lo cual limita sus posibilidades terapéuticas.

Independiente de la etapa en la que se genere la resistencia, dentro de los factores asociados a ésta se encuentran los altos niveles de PSA en la sangre, lo cual demuestra una alta actividad del receptor de andrógenos, y la presencia de variantes de *splicing* del receptor de andrógenos. Tal es la relevancia de este receptor y sus variantes que son un marcador asociado a CRPC (Miyamoto et al., 2012).

Tomando en cuenta la relevancia que tiene el receptor de andrógenos y la generación de variantes, es importante saber que el gen que lo codifica está compuesto por 8 exones, donde el exón 1 compone el dominio N-terminal, el cual posee el dominio de función de activación 1 (AF1), los exones 2 y 3 componen los dominios de unión al ADN, parte del exón 4 forma parte del dominio bisagra y una porción del exón 4 hasta el exón 8 componen el dominio

de unión a ligando (LBD). Al momento de generarse variantes de *splicing*, 4 exones críticos son relevantes, ya que remplazan uno o más exones del gen. En el caso de AR-V7, una de las variantes con mayor importancia en CRPC, que es la responsable de la activación constitutiva de la señalización del receptor de andrógenos, aún en ausencia de ligandos, solo se expresan los exones 1, 2, 3 de la proteína nativa, además del exón crítico CE3 lo cual genera una proteína que carece del dominio LBD, pero mantiene las regiones de activación funcional AF1 y de unión al ADN (J. Luo et al., 2018; Y. Zhu et al., 2021) (figura 1), esto genera que, a diferencia de AR nativo, AR-V7 no presenta el sitio de unión a ligando (DHT) sobre el cual actúa de forma antagónica enzalutamida (Buttiglierio et al., 2015). La expresión de AR-V7 es clínicamente relevante dado que una comparación entre pacientes AR-V7 negativo con AR-V7 positivo, demostró que estos últimos poseían menor tiempo de supervivencia, de hecho, en pacientes con CRPC metastásico tratados con enzalutamida, el 39% presenta AR-V7 en sus células tumorales (Antonarakis et al., 2015; Buttiglierio et al., 2015; Y. Zhu et al., 2021). La problemática que genera la presencia de AR-V7 en los pacientes y la resistencia a enzalutamida es que, un porcentaje no menor de pacientes (9 - 15% aproximadamente) podría generar resistencia (Antonarakis et al., 2015; Fujita & Nonomura, 2019), por lo cual es importante evitar la resistencia o generar terapias adyuvantes que prevengan o refuercen sinérgicamente este fármaco, teniendo en cuenta que en Chile el MINSAL indica enzalutamida como uno de los primeros fármacos a utilizar en CRPC.

De igual manera, se ha reportado que pacientes con resistencia a enzalutamida, presentan altos niveles de AR, ya sea por sobreexpresión o la presencia de variantes de *splicing*. Así también se ha reportado que la activación de vías de señalización NF-κB, la expresión de la citoquina IL-6 y activación de STAT3 promueven la sobreexpresión de AR, sus variantes de mayor relevancia clínica como AR-V7 (L. Zhang et al., 2009). Este factor de transcripción está además asociado a la promoción de crecimiento celular en CRPC, lo cual puede estar dado por la relación que hay entre la activación de NF-κB y AR-V7 (Jin et al., 2015). De hecho, tanto en la hiperplasia benigna de próstata como en cáncer de próstata, se ha demostrado que existe una relación entre la vía de señalización de NF-κB y el aumento en la progresión tumoral, el cual como se ha comentado anteriormente se encuentra asociado al aumento en la expresión de AR-V7 (J. Sun et al., 2020).

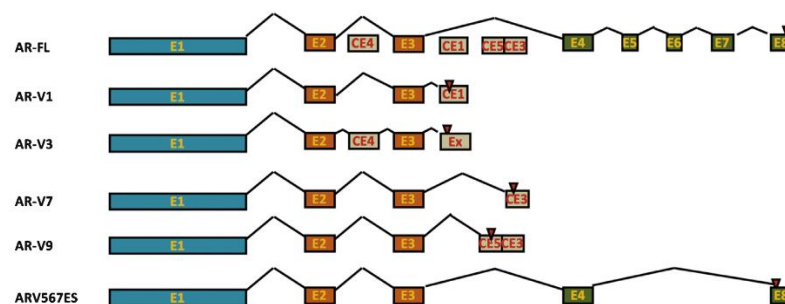


Figura 1: Conformación de las diferentes variantes de splicing de AR. (E = exón, CE = exón críptico EX = exón desconocido). El AR-FL (*Full lenght*) o nativo está conformado por los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En las otras variantes se logra apreciar que AR presenta variantes de menor peso molecular que utilizan algunos exones o exones crípticos. En el caso particular

de AR-V7, está compuesto por exón 1, 2, 3 y CE3. Imagen obtenida desde Luo, *et al* 2018.

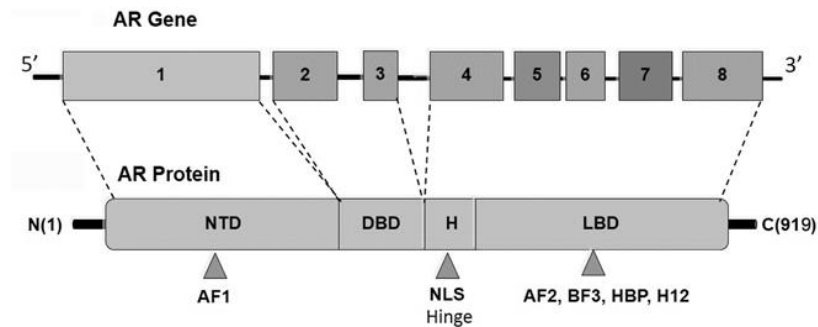


Figura 2: Esquema estructural de AR. NTD (dominio N terminal) formado por el exón 1, DBD corresponde al dominio central de unión al ADN (DBD) formado por los exones 2 y 3, una pequeña región cuello formada por parte del exón 4 y finalmente el dominio de unión a ligando formado por los exones 4 al 8, el cual posee el dominio conocido como bolsillo de unión a hormona (HBP). Imagen obtenida desde Tian *et al.*

La figura 1 indica las diferencias entre AR y AR-V7, la cual se debe a las ausencias de los exones 4, 5, 6, 7, 8. Esta ausencia por lo mostrado en la figura 2, se traduce en la ausencia del sitio de unión al ligando aun teniendo presente el dominio de unión al ADN. De esta forma es posible explicar el rol en la resistencia a enzalutamida que posee AR-V7, debido a que actúa uniéndose a LBD (J. Luo et al., 2018; Tian et al., 2015).

3.3. LOX-1 y LDL oxidada, su función en cáncer.

El receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidada (LOX-1), es una glicoproteína integral de membrana tipo II, posee un dominio citoplasmático

de 34 aminoácidos que contiene el N terminal, su dominio extracelular está compuesto de un cuello (82 aminoácidos) y el dominio de unión a ligando, tipo lectina C (131 aminoácidos), hacia el C terminal (figura 3A) (Balzan & Lubrano, 2018; Raniolo et al., 2016). Su estructura en membrana es un homodímero que, para poder unir al ligando, necesita de la formación de un hexadímero (Figura 3B). Los principales ligandos de LOX-1 son la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL, por su sigla en inglés), células apoptóticas, bacterias Gram negativas, y proteína C reactiva (Taye & El-Sheikh, 2013), las cuales median la activación el receptor, induciendo su endocitosis. La expresión y función de este receptor se ha asociado principalmente a contextos fisiopatológicos y a la fecha no se le conocen regulación de funciones fisiológicas, es así que este receptor se encuentra asociado a patologías como aterosclerosis, diabetes, obesidad, hipertensión, infarto agudo al miocardio, infarto cerebrovascular y cáncer, entre otros (Balzan & Lubrano, 2018). Estas características que lo convierte en un blanco de interés para posibles tratamientos de enfermedades crónicas donde cumple un rol fundamental.

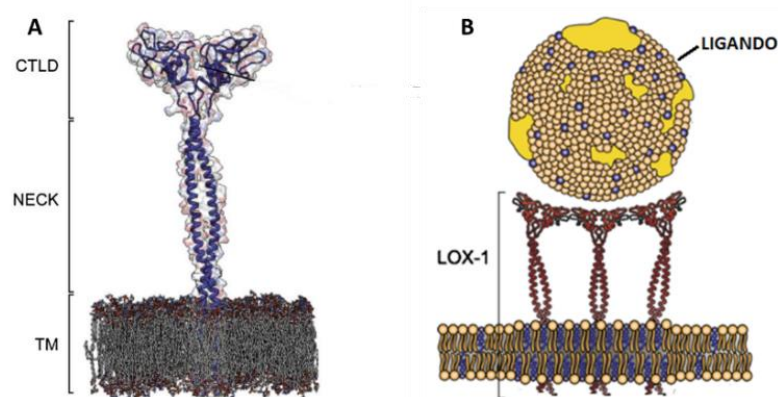


Figura 3: Receptor de LDL oxidada LOX-1. (A) Representación tridimensional de los dominios transmembrana (TM) y extracelular de LOX-1. (B) Representación del hexámero formado por los tres homodímeros de LOX-1 para la unión al ligando.

Al activarse LOX-1, por la unión con oxLDL, se induce una activación del complejo proteico NADPH oxidasa (Pirillo et al., 2013). Esta activación de NADPH oxidasa genera el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante la producción del anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se ha descrito en modelos celulares asociados a aterosclerosis, como células endoteliales (CE) y macrófagos que, como consecuencia del aumento de ROS, el cual es inducido por la activación de LOX-1, se promueve la activación de la vía canónica de NF- κ B (Quinn et al., 2006), desencadenando la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β , IL-8 (Taye & El-Sheikh, 2013). Estudios han reportado la sobreexpresión del receptor LOX-1 en diferentes tipos de cáncer como cáncer de cérvix, vejiga, colorrectal, mama, pulmón, gástrico, páncreas y próstata (Balzan & Lubrano, 2018). En cáncer colorrectal, tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Bray

et al., 2018), un análisis de expresión de ARNm reportó una sobreexpresión de un 20% en células DLD-1, junto con ello, se observó que dicha sobreexpresión de LOX-1 se encuentra sólo en aquellos tejidos con presencia de células cancerígenas y no en tejido sano, de igual manera, estudios *in vitro* demostraron la importancia de este receptor para la proliferación celular y finalmente estudios clínicos demostraron que la sobreexpresión de LOX-1 está relacionada directamente con la agresividad del tumor en el paciente (Murdocca et al., 2016). En cáncer gástrico, se reportó que en células MGc80-3 que se les sobreexpresó LOX-1, su activación promueve la migración e invasión mediada por el aumento en la fosforilación de AKT y de GSK3 β (C. Li et al., 2017).

El aumento de LOX-1 es algo que también se ha evidenciado en cáncer de próstata, una comparación entre células RPEW-1 (células normales de próstata) y células de las líneas RPEW-2, PC-3, DU-145, C4-2, C4-2B y LNCaP (líneas celulares de cáncer de próstata), indicó que en éstas últimas LOX-1 se encuentra sobreexpresado, interesantemente, las líneas DU-145, PC-3, C4-2 y C4-2B son líneas celulares CRPC. De igual manera, se demostró que la expresión de LOX-1 está aumentada en adenocarcinoma prostático, en comparación a próstata normal en pacientes.

La activación de LOX-1 por oxLDL en cáncer de próstata produce un aumento en la angiogénesis tumoral, un aumento en la transición epitelio mesenquimal, un aumento en la proliferación celular, potencial tumorigénico y estudios *in vivo* demostraron que este receptor es necesario para el crecimiento tumoral

de células C4-2B (células CRPC). Esta sobreexpresión de LOX-1, está directamente relacionada a la capacidad de estimulación de la proliferación celular, tal como lo demostró Wan *et al*, al comparar células LNCaP y PC-3, donde éstas últimas aumentaron más su proliferación que las primeras al ser expuestas a oxLDL, teniendo PC-3 una mayor expresión de LOX-1 que LNCaP y siendo esta última una línea celular sensible a andrógenos, en comparación a PC-3 que es una línea CRPC, y que oxLDL induce la activación de vías de señalización β -catenina, NF- κ B, STAT1, STAT3 en células PC-3 (Schmeisser *et al.*, 2004). De igual manera este estudio demostró que pacientes con cáncer de próstata avanzado presentan altos niveles de oxLDL en comparación a pacientes con cáncer de próstata en estado patológico de menor grado.



Respecto a la función de LOX-1 en cáncer, su expresión y función lo posicionan como un potencial blanco terapéutico, para varios tipos de cáncer, como, por ejemplo, cáncer de próstata, de igual manera la vía de señalización activadas por LOX-1 y sus inductores como ROS son un blanco relevante para inhibir los procesos mediados por este receptor. En la siguiente sección se revisará el rol de ROS en el contexto fisiológico y fisiopatológico con especial énfasis en cáncer y su función sobre NF- κ B.

3.4. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, rol fisiológico y fisiopatológico.

El estrés oxidativo corresponde a un fenómeno relacionado a la excesiva presencia de agentes oxidantes, generalmente especies reactivas de oxígeno

(ROS), en el organismo o en la célula (Durackova, 2010). ROS son producidas por los organismos como resultado del metabolismo, mayormente en la respiración celular (Reuter et al., 2010), son generadas por enzimas, siendo una de las más importantes a nivel endotelial la NADPH oxidasa. ROS pueden ser moléculas en cuya estructura hay al menos un átomo de oxígeno y que tienen un electrón desapareado (radicales libres) o no radicales, siendo los con mayor significancia fisiológica el anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno (Birben et al., 2012). Cuando se encuentran en concentraciones bajas, éstas participan en procesos como la inducción de apoptosis, oxidación de residuos en proteínas o la generación de respuesta inmune mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias (Mittler, 2017).

En contraste, cuando los niveles de ROS aumentan en el organismo, es perjudicial para la salud, dado que puede producir modificaciones en lípidos, proteínas, además de generar daño a nivel de ADN (Birben et al., 2012). Se han encontrado asociadas a niveles altos de ROS enfermedades como diabetes, obesidad, cáncer (Durackova, 2010). Debido al daño que ROS produce en el ADN, ayuda a la primera etapa del cáncer (iniciación), por la producción de genes anormales (Reuter et al., 2010), que puede generar proteínas disfuncionales, por ejemplo, aquellas cuya función es reparar los daños producidos en el ADN durante la etapa de división celular. La presencia altos niveles de ROS al inducir citoquinas proinflamatorias, genera la inflamación crónica (Durackova, 2010), en la que por acción de las mismas citoquinas se induce la producción de ROS, generando retroalimentación positiva (Reuter et al., 2010). La expresión de citoquinas proinflamatorias es

activada principalmente debido a que los altos niveles de ROS activan la quinasa de I κ B (iKK), la cual fosforila al inhibidor de NF- κ B (I κ B), llevándolo a degradación y activando a NF- κ B (p50/p65), el cual transloca al núcleo de la célula y regula la transcripción de ARNm de factores de adhesión celular, proteínas antiapoptóticas y citoquinas proinflamatorias como IL-1B, IL-6, IL-8 (Birben et al., 2012; Pande et al., 2015). En cáncer de próstata avanzado, el estrés oxidativo, se asocia directamente con la agresividad del tumor, influyendo en el desarrollo, progresión e incluso a la respuesta hacia el tratamiento de la patología (Wan et al., 2015).

Estos antecedentes nos permiten postular que la inhibición en la generación de estrés oxidativo mediada por el receptor LOX-1 o por otros componentes que inducen su generación podría ser relevante para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado y resistente a castración o para prevenir la activación de vías de señalización como NF- κ B y la secreción de IL-6 y la activación de STAT3, que son de vital importancia para la resistencia a drogas como enzalutamida. En la siguiente sección se analizará el potencial de los metabolitos secundarios, como los flavonoides en el contexto de cáncer

3.5. Metabolitos secundarios, flavonoides y su actividad antioxidante

Los niveles en la concentración de ROS en las células se mantienen en rangos adecuados mediante dos mecanismos, el mecanismo enzimático y el no enzimático. El enzimático utiliza peroxidasas, que mayormente actúan transformando el H₂O₂ en agua dentro de la célula, algunos ejemplos son la glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Chio & Tuveson,

2017). La forma no enzimática, es aquella que utiliza compuestos antioxidantes, que pueden ser endógenos al organismo como proteínas, aquí encontramos los transportadores de hierro iónico o la albúmina; además existen aquellos compuestos antioxidantes obtenidos de forma exógena al organismo, ya sean moléculas de bajo peso molecular (vitaminas) o compuestos bioactivos producidos por el metabolismo secundario de plantas (Birben et al., 2012; Durackova, 2010).

Los metabolitos secundarios no pertenecen al metabolismo primario, el cual genera compuestos que son importantes para que el ciclo de vida de las plantas, sino que se generan para brindar protección contra distintos factores de estrés como la radiación o protección contra depredadores (Metlen et al., 2009), estos son utilizados con fines medicinales desde la antigüedad con el fin de mitigar síntomas o curar enfermedades, los avances tecnológicos permitieron sintetizar total o parcialmente compuestos con actividad medicinal (Marcia Avello & Isabel Cisternas, 2010). En Chile existe una variada flora nativa y endémica, utilizada por los diversos pueblos originarios para curar enfermedades. Plantas como *Aristolelia chilensis* (Maqui), *Centaurea chilensis* (Flor del minero), tienen un perfil de metabolitos secundarios conocido mayoritariamente (Molares & Ladio, 2009; Montenegro G, Gómez M, Iturriaga L, 1994). Existen plantas cuyos compuestos aún no han sido completamente estudiados, aquí toma relevancia la etnobotánica, disciplina que estudia la relación de la sociedad con las plantas, que permite inferir qué tipo de metabolitos secundarios podría tener una planta, ya que aquellas pertenecientes a una misma familia pueden tener metabolitos similares (Rios,

Alvaro, Alanis, Glafiro, Favela, 2017). En cambio, existen plantas como *Maytenus disticha*, que aún no han sido caracterizada por completo, la cual podría ser fuente de metabolitos de interés con alguna actividad biológica. Esta especie es un arbusto leñoso conocido comúnmente como maitén enano o Maitencillo (Barrera & Meza, 1982).

Los metabolitos secundarios se dividen en grupos de acuerdo a su estructura, entre estos podemos encontrar terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos (Kabera et al., 2014). En los compuestos fenólicos encontramos los polifenoles, estructuralmente poseen varios anillos fenólicos, los que le dan capacidad antioxidante (Quiñones et al., 2012), pueden ser sintetizados en diversas partes de la planta (Kabera et al., 2014). Dentro de este grupo están los flavonoides, que están compuestos por dos anillos fenólicos unidos por una estructura cíclica de tres carbonos (Awouafack et al., 2016). Por los grupos hidroxilo que éstos poseen, pueden estabilizar ROS cediendo un hidrógeno, generando el radical flavínico, el que es estabilizado producto de la resonancia del anillo aromático, por otra parte, luego de la formación de dicho radical, pueden estabilizar ROS mediante la formación de quinonas (Nieto et al., 1993; Quiñones et al., 2012). Otro mecanismo de acción antioxidante es la quelación de metales, lo que previene la formación de ROS por la reacción de Fenton (Quiñones et al., 2012). Así, los polifenoles son un grupo de moléculas que podrían tener un potencial terapéutico importante en patologías o procesos en los cuales el aumento de ROS sea un evento determinante, como lo es la resistencia a enzalutamida. En esta tesis se analizaron dihidromiricetina y quercetina, extraídos de *Maytenus disticha*.



Figura 4: *Maytenus disticha*. Imagen obtenida desde chileflora

Dihidromiricetina es un flavonoide perteneciente a la subcategoría flavan-3-ol, que posee grupos hidroxilo en los carbonos 3, 5, 7, 3', 4' y 5'. Es conocido como ampelopsina, debido a que es uno de los principales compuestos bioactivos de *Ampelopsis grossedentata*. Esta planta fue utilizada en la medicina tradicional China para tratar hipertensión y problemas cardíacos, actividad que se atribuye a la dihidromiricetina (B. Huang et al., 2018)(Hou et al., 2015). Además, se ha demostrado que puede tener un efecto protector del daño cardíaco provocado por doxorubicina, por inhibición de NLRP3 (Z. Sun et al., 2020).

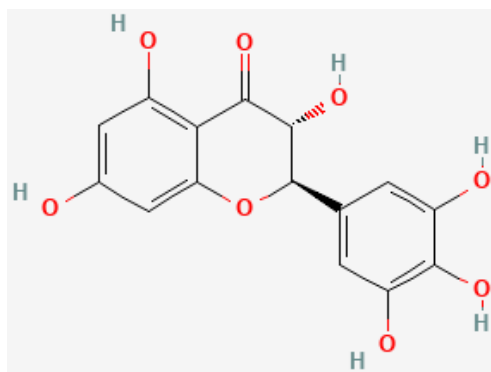


Figura 5: Estructura química de dihidromiricetina. Obtenida desde Pubchem.

Este compuesto también presenta actividad contra diferentes enfermedades metabólicas y cáncer. Una de las enfermedades en que se ha encontrado actividad de dihidromiricetina es la aterosclerosis. En esta patología, se ha reportado que inhibe la fagocitosis de lípidos y de esta forma evitar la formación de células espumosas (T. T. Liu et al., 2017). Wang y colaboradores, indican que existe una relación dosis dependiente en la inhibición de la transición epitelio mesenquimal en células MKN45 (Wang et al., 2019).

En bajas dosis, se ha encontrado que dihidromiricetina tiene actividad contra *Fusobacterium nucleatum*, la cual cumple un rol fundamental en cáncer de colon (X. H. Zhu et al., 2019). En ratones deficientes de receptor de LDL, dihidromiricetina disminuye los niveles de ROS, baja la concentración de oxLDL en sangre y también la expresión de ARNm para IL-6 en individuos sometidos a una dieta alta en grasas. En células HUVEC, células endoteliales de cordón umbilical, dihidromiricetina produjo una disminución en la activación

de NF- κ B y producción de ROS al ser tratadas con oxLDL (T. T. Liu et al., 2017). En células HUVEC, dihidromiricetina disminuye la expresión de LOX-1 y el estrés oxidativo inducido por oxLDL (Y. Luo et al., 2017).

Por otra parte, quercetina es un flavonoide perteneciente a la subclase de los flavonoles, el cual presenta cinco grupos hidroxilo en posiciones 3', 4', 3, 5 y 7 de los anillos bencénicos, Figura 6 (Formica & Regelson, 1995).

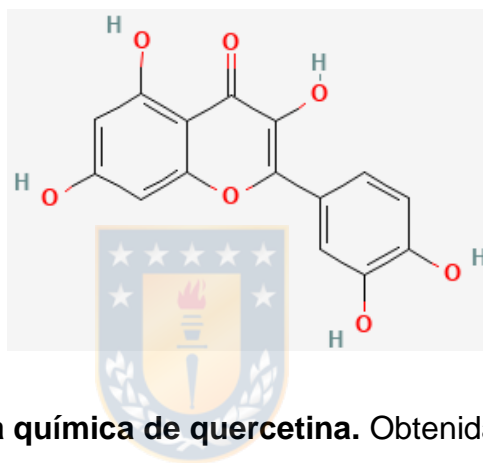


Figura 6: Estructura química de quercetina. Obtenida desde Pubchem.

El tratamiento con dosis orales de quercetina en ratas Lewis produjo un aumento de la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo, junto con la reducción la activación de NF- κ B y una disminución en la secreción de IL-1 (Gardi et al., 2015). En células de cáncer de próstata, PC3, quercetina no sólo genera una disminución de la activación de NF- κ B, sino que también en la activación de otras vías de señalización implicadas en la progresión tumoral de dicha patología (Senthilkumar et al., 2011). En células de hepatoma humano (HepG2) quercetina disminuye la relación entre NF- κ B en el núcleo y en el citoplasma, inhibiendo la translocación nuclear progresivamente. La fosforilación de la quinasa del inhibidor de NF- κ B también es disminuida por este flavonoide (Granado-serrano et al., 2010).

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte por enfermedad crónica a nivel mundial. En específico el cáncer de próstata es el con mayor incidencia en la población masculina y está entre las 3 primeras causas de muerte por cáncer en hombres. Su tratamiento en etapas avanzadas se basa en castración química, sin embargo, el cáncer de próstata genera resistencia a éste, produciendo un cáncer de próstata resistente a castración. El tratamiento de cáncer de próstata resistente a castración está basado principalmente en la utilización de tres drogas: enzalutamida, abiraterona o docetaxel, sin embargo, la aparición de resistencia a estos fármacos es recurrente en pacientes con CRPC. Esto afecta de diversas formas al paciente, ya sea en una merma en su calidad de vida y el tiempo de sobrevivencia, además de conllevar un impacto económico tanto para el paciente como para la salud pública. Es por esto por lo que la búsqueda de blancos terapéuticos a marcadores de resistencia a enzalutamida en modelos CRPC toma una importancia en la investigación biotecnológica. Resultados de nuestro grupo han demostrado que el receptor LOX-1 a través de su activación por oxLDL, podría iniciar la cadena de vías de activación NF- κ B, la cual genera la expresión de AR y AR-V7, receptores clave en la resistencia a enzalutamida. En modelos de células endoteliales se ha descrito que la activación de LOX-1 induce la generación de ROS, los cuales inician la cascada de señalización de NF- κ B. Nuestro grupo recientemente ha aislado flavonoides desde *M. disticha*, tales como quercetina y dihidromiricetina, las cuales podrían prevenir la activación de NF- κ B inducida por LOX-1, a través de su capacidad *scavenger* de ROS.

5. HIPÓTESIS

Los flavonoides dihidromiricetina y quercetina previenen el desarrollo de resistencia a enzalutamida, inducida por LOX-1/oxLDL a través de la prevención de la activación de la vía NF- κ B.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General:

Analizar el efecto de LOX-1/oxLDL en la resistencia a enzalutamida y determinar si los flavonoides dihidromiricetina y quercetina, provenientes de *M. disticha* pueden prevenir este efecto a través de la disminución de la generación de ROS y la consecuente inactivación de la vía NF- κ B

6.2. Objetivos Específicos:

- 1) Determinar la función de LOX-1/oxLDL en la resistencia a enzalutamida mediada por la activación de la vía NF- κ B.
- 2) Determinar el efecto de los flavonoides dihidromiricetina y quercetina en la prevención de la resistencia a enzalutamida inducida por LOX-1/oxLDL.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Generación líneas celulares con silenciamiento de LOX-1.

Se sembraron 500.000 células C4-2B en placas de 6 pocillos por 24 horas en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino. Para realizar la transfección se agregaron 150 picomoles de ARN de interferencia contra el receptor LOX-1 o ARN de interferencia control en 200 μ L de medio Opti-MEM, de igual manera se realizó una mezcla de 200 μ L de medio Opti-MEM con 6 μ L de lipofectamina 3000. Estas mezclas fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizó un cambio de medio a las células C4-2B y se les agregó Opti-MEM, luego se agregaron 400 μ L de la mezcla antes mencionada y se dejaron en incubación en condiciones de cultivo, por 16 horas para luego agregar 1 mL de medio RPMI al 10%. Las células se mantuvieron por 48 horas y luego se confirmó el silenciamiento de LOX-1 mediante western blot. El mismo procedimiento se realizó para cada uno de los ensayos en los que LOX-1 fue silenciado.

7.2. Transfección de células para análisis de actividad p65 asociado a reportero luciferasa.

Se sembraron 1.000.000 células C4-2B en placas de 6 pocillos por 24 horas en medio RPMi con 10% de suero fetal bovino. Para realizar la transfección se agregó 1 μ g plásmido pHAGE-NF- κ B-TA-LUC-UBC-dTomato-W en una mezcla de ADN con el reactivo P3000 en 200 μ L de medio Opti-MEM en relación 1:1 (v/v), se realizó también una mezcla de 200 μ L de medio Opti-MEM con 2 μ L de lipofectamina 3000. Estas se mezclaron y se incubaron

durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizó un cambio de medio a las células y se les agregó Opti-MEM, luego de este cambio de medio se agregaron 400 μ L de la mezcla antes mencionada y se dejaron incubando en condiciones de cultivo. Para confirmar que las células fueron transfectadas se utilizó microscopio de fluorescencia con filtro 580 nm, aquellas células con el plásmido pHAGE-NF- κ B-TA-LUC-UBC-dTomato-W se observaron de color rojo al microscopio.

Las células fueron expandidas a dos placas de seis pocillos y una de ellas fue transfectada con ARN de interferencia contra LOX-1 y ARN de interferencia control, como se mencionó anteriormente, para hacer tratamientos con oxLDL.

7.3. Determinación del efecto de oxLDL y LOX-1 en la generación de ROS en células C4-2B.

Se sembraron por pocillo 20.000 células C4-2B con siARN control y C4-2B con siARN contra LOX-1 en placas negras para fluorescencia por 24 horas. Luego, se procedió a realizar tratamientos de 10 μ g/mL de extracto total de *M. disticha*, 50 μ M de dihidromiricetina, 25 μ M quercetina, 5 μ M de trolox como control positivo de actividad antioxidante. Luego de 60 minutos, se agregó 5 μ M de la sonda CM-H₂DCFDA. Se incubó por 15 minutos, luego las células fueron tratadas con dosis de 50 μ g/mL de oxLDL en los pocillos. Luego se incubaron las células en condiciones de cultivo (37°C y 5% CO₂) y se realizó una medición de fluorescencia 480-530 nm en fluorímetro *Synergy HTX multi-mode reader* a los 90 minutos post incubación con oxLDL.

7.4. Determinación del efecto de oxLDL y LOX-1 en la activación de NF- κ B en células con C4-2B, a través de western blot.

Para analizar la activación de la vía NF- κ B, se sembraron 400.000 células C4-2B con siARN control y C4-2B con siARN contra LOX-1 en placas de 12 pocillos. Se realizó un tratamiento con oxLDL 50 μ g/mL, por 60 minutos. Luego se realizó una extracción de proteínas con 300 μ L de buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa en hielo. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método de BCA. Para las electroforesis en gel de poliacrilamida 10% en condiciones denaturantes, se utilizaron 30 μ g de proteínas totales, la separación de proteínas se realizó a un voltaje constante de 150 V. Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas, mediante método semiseco a membrana de nitrocelulosa de 0,22 μ m por 30 minutos a 0,3 A y 25 V en el equipo BioRad Trans-Blot Turbo. Posterior a la transferencia, se bloqueó con leche descremada al 5% por 30 minutos y se aplicó a las membranas anticuerpos para NF- κ B subunidad p65 y su forma fosforilada, además se utilizó el anticuerpo I κ B y su forma fosforilada, estos anticuerpos se incubaron toda la noche a 4°C. Luego las membranas se lavaron con buffer se incubaron en anticuerpos conjugados Alexa Fluor anti – *mouse* 790 para las proteínas fosforiladas y anti – *rabbit* 680 para la forma no fosforilada de la proteína. GAPDH (mouse monoclonal Santa Cruz) fue utilizado como normalizador y se utilizó anticuerpo conjugado Alexa Fluor anti – *mouse* 790 para escanear las membranas. Todos los anticuerpos fueron preparados en leche descremada 2,5% con 0,1% de tween en TBS 1X. Posterior a las incubaciones antes

mencionadas las membranas se escanearon las membranas en equipo LiCOR CLX.

7.5. Determinación del efecto de oxLDL y LOX-1 en la activación de NF- κ B en células con C4-2B, a través del análisis de actividad p65 asociado a reportero luciferasa.

Para la medición de la actividad de p65, se utilizó el vector NF- κ B-TA-LUC-UBC-dTomato-W con lucifereasa bajo un promotor mínimo para p65. Como fue mencionado anteriormente, las células fueron transfectadas con el vector y posteriormente con siARN control y siARN contra LOX-1. Las células fueron tratadas con 50 μ g/mL de oxLDL por 24 horas. Posteriormente se utilizó el *kit Luciferase Assay System* (Promega), se agregó buffer de lisis, este lisado celular fue traspasado a tubos de 600 μ L, se centrifugaron a 12.000 RPM y se recuperó el sobrenadante. Para finalizar se utilizaron 20 μ L y se mezclaron con 100 μ L del reactivo *Luciferase assay* y se midió la luminiscencia en lector de placa *Synergy HTX multi-mode reader*.

7.6. Efecto de LOX-1/oxLDL sobre la citotoxicidad de enzalutamida.

Para ver el efecto de la oxLDL y LOX-1 sobre la citotoxicidad de enzalutamida, se realizó un ensayo en placa de 96 pocillos con 20.000 células por pocillo, y se realizó un tratamiento con oxLDL. Pasadas 24 horas desde el tratamiento con oxLDL, se realizaron tratamientos de enzalutamida de 20 μ M de dicha droga. Las células se mantuvieron por 72 horas en condiciones de cultivo, luego fueron fijadas con etanol al 70% y se tiñeron con cristal violeta 1%. Una vez lavado el exceso de cristal violeta, se agregaron 100 μ L de metanol. De

esta forma se evaluó la diferencia en la citotoxicidad celular para dicha concentración de enzalutamida y la dosis de oxLDL.

7.7. Determinación del efecto de LOX-1 en la expresión de marcadores de resistencia a enzalutamida en células de cáncer de próstata.

Se sembraron 400.000 células por pocillo en placa de 12 pocillos, de las líneas celulares C4-2B, éstas se trataron con oxLDL en dosis de 50 µg/mL, estos tratamientos se mantuvieron por 24 horas, tras las cuales se procedió a extraer proteínas con buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas. Las proteínas se cuantificaron mediante reactivo de Bradford y se les realizó western blot, de la manera mencionada anteriormente. Los anticuerpos utilizados fueron AR y AR-V7, el normalizador utilizado fue GAPDH y las membranas fueron escaneadas en el equipo LICOR-CLX.

7.8. Extracción y purificación de dihidromiricetina y quercetina a partir de *Maytenus disticha*.

Se recolectaron 7.0 kg de partes aéreas de *Maytenus disticha* en la zona cercana al volcán Villarrica. El material fue secado, molido y posteriormente macerado en acetato de etilo/metanol (1:1/10 L) durante tres días, procedimiento realizado por duplicado. Tras cada maceración el solvente fue removido mediante evaporación al vacío a una temperatura de 40°C y presión de 200 mbar, obteniendo un extracto total orgánico. El extracto total fue fraccionado mediante cromatografía en gel de sílice (CC) eluída con hexano y acetato de etilo (EtOAc) como fase móvil. La polaridad se fue aumentando desde hexano 100% hasta EtOAc 100%. Las fracciones obtenidas se

analizaron mediante cromatografía de capa fina (TLC). En la fracción 9 (hex/EtOAc 1:4 v/v) se obtuvo una molécula que tras evaporación lenta del solvente a 20°C generó un sólido blanco, el cual fue analizado mediante resonancia magnética nuclear de 1 y 2 dimensiones (RMN). El producto obtenido fue identificado como dihidromiricetina. Desde la fracción 10 (EtOAc 100 %) se obtuvo un sólido amarillento identificado por RMN como quercetina.

7.9. Efecto de dihidromiricetina y quercetina en la activación de la vía NF-κB inducida por oxLDL.

Se realizaron western blot para la expresión de la fosforilación de NF-κB p65 y de IκB, para ello se sembraron 400.000 células de las líneas C4-2B en placas de 12 pocillos, se realizó un pretratamiento con 50 μM de dihidromiricetina y 25 μM de quercetina, luego de una hora las células se trataron con una dosis de 50 μg/mL de oxLDL. Pasada 1 hora desde la aplicación de los respectivos tratamientos, se realizó la extracción de proteínas utilizando buffer RIPA, inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Una vez cuantificadas las proteínas, se utilizaron 30 μg de proteína total para una electroforesis en gel al 10% de poliacrilamida y se realizó un western blot, siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

7.10. Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la expresión de marcadores de resistencia docetaxel inducida por oxLDL.

Para el análisis de AR y AR-V7, se realizaron western blot. Las proteínas fueron obtenidas de la misma forma que se describió anteriormente, a partir

de células C4-2B tratadas con oxLDL en dosis 50 µg/mL, pretratadas por una hora con 50 y 25 µM de dihidromiricetina y quercetina respectivamente. La extracción de proteínas se realizó tras 24 horas de incubación post tratamiento con oxLDL. Los western blot se realizaron siguiendo el protocolo utilizado anteriormente para el análisis de dichos marcadores de resistencia.

7.11. Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la citotoxicidad de enzalutamida en células tratadas con oxLDL.

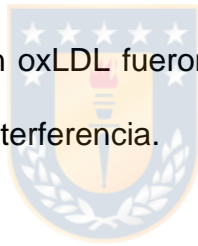
Para ver el efecto de los flavonoides cuando las células están tratadas con oxLDL sobre la citotoxicidad de enzalutamida, se realizó un ensayo en placa de 96 pocillos con 20.000 células por pocillo, para esto, las células se pretrataron con 50 µM dihidromiricetina y 25 µM de quercetina por 1 hora, posteriormente se realizó un tratamiento con oxLDL 50 µg/mL. Pasadas 24 horas desde el tratamiento con oxLDL, se realizaron tratamientos en dosis de 20 µM de enzalutamida. Las células se mantuvieron por 72 horas en condiciones de cultivo, las células se fijaron con etanol al 70% y se tiñeron con cristal violeta 1%. Una vez lavado el exceso de cristal violeta, la placa fue escaneada en equipo LICOR-CLX. De esta forma se evaluaron los cambios en la citotoxicidad de enzalutamida para la condición descrita.

8. RESULTADOS

8.1. Silenciamiento de LOX-1 con ARN de interferencia.

Para determinar la función del receptor LOX-1 y la oxLDL en la resistencia a enzalutamida, se realizó el silenciamiento del receptor utilizando la tecnología de ARN de interferencia, para esto las células fueron transfectadas con un ARN de interferencia contra LOX-1, dos días post transfección se evaluó el correcto silenciamiento mediante western blot. Los resultados indicaron que la expresión protética de LOX-1 disminuyó aproximadamente en un 50%, tal como se indica en la figura 7.

Todos los tratamientos con oxLDL fueron realizados dos días posterior a la transfección con ARN de interferencia.



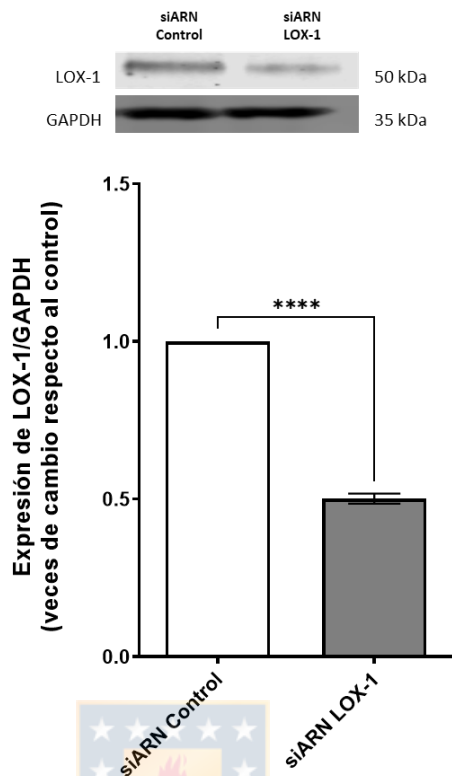


Figura 7: Expresión de LOX-1 en células C4-2B transfectadas con ARN de interferencia por 48 horas. Células C4-2B fueron transfectadas con ARN de interferencia contra LOX-1. Para confirmar el silenciamiento del LOX-1, se comparó mediante western blot la expresión de éste en células con ARN de interferencia control y con ARN de interferencia hacia OLR-1. Se evaluó la significancia mediante Test de t-student ($***p \leq 0.001$, $**p \leq 0.01$, $*p \leq 0.05$), con un $n=3$.

8.2. LOX-1/oxLDL promueve la generación de ROS en células CRPC.

Para ver el efecto que la oxLDL (50 µg/mL) sobre la generación de ROS en modelos celulares CRPC, se utilizó la sonda CM-H2DCFDA en células transfectadas con siARN control o siARN LOX-1. Los resultados muestran que los estímulos de oxLDL incrementan significativamente la generación de ROS en las células transfectadas con siARN control. Al silenciar el receptor LOX-1, no existe un aumento significativo en la generación de ROS, respecto a su control. Sin embargo, al comparar los tratamientos con oxLDL, entre células transfectadas con siARN control vs siARN LOX-1, las células transfectadas con ARN de interferencia hacia LOX-1, existe una prevención en la generación de ROS de un 48% aproximadamente, como se muestra en la gráfica de la figura 8.



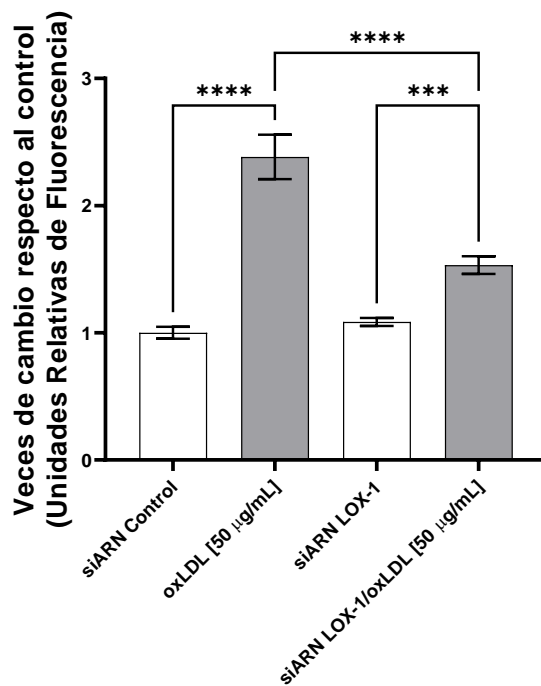


Figura 8: Análisis generación de ROS en células C4-2B transfectadas con ARN de interferencia contra LOX-1, estimuladas con oxLDL por 180 minutos. La generación de especies reactivas de oxígeno inducida por oxLDL, se comparó utilizando células C4-2B con ARN de interferencia contra LOX-1, midiendo la oxidación de la sonda CM-H₂DCFDA a igual tiempo. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$) con un $n=3$. Veces de

8.3. LOX-1/oxLDL promueve la activación de NF-κB en células C4-2B.

Para analizar el efecto de oxLDL sobre la activación de la vía de NF-κB, se realizaron tratamientos de 50 µg/mL de oxLDL en células con ARN de interferencia contra LOX-1 y ARN de interferencia control. Estos tratamientos se mantuvieron por 1 hora para extraer proteínas y hacer mediciones de las fosforilaciones de IκB-α y NF-κB, mediante western blot.

Se puede observar que, en las células transfectadas con siARN control, hay un aumento en la fosforilación de IκB-α (figura 9) y de la subunidad p65 de NF-κB (figura 10) al tratar las células con una dosis de 50 µg/mL de oxLDL, por otra parte, en las células con el ARN de interferencia contra LOX-1, se previene tanto la fosforilación de IκB-α en un 43% como la fosforilación de NF-κB p65 en un 36%. Esto indica que LOX-1/oxLDL está relacionado con la activación de la vía de NF-κB.

Se puede observar en la figura 11, que existe un aumento en la luminiscencia al tratar con oxLDL las células parentales, pero al comparar con las células con ARN de interferencia tratadas con oxLDL, hay una diferencia de un 48% en la actividad luciferasa asociada a la activación de NF-κB.

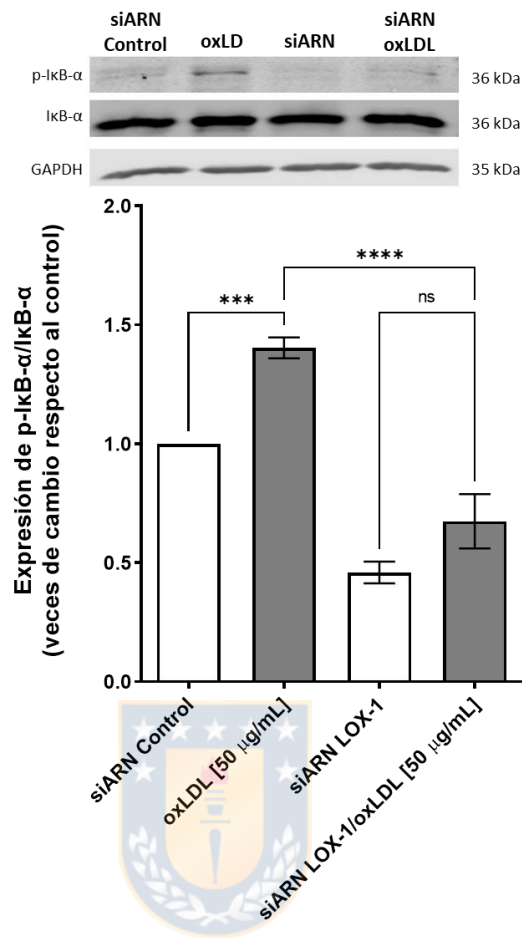


Figura 9: Expresión de IkB fosforilado en células C4-2B siARN control y C4-2B con ARN de interferencia contra LOX-1 con y sin oxLDL, 60 minutos post tratamiento con oxLDL. Análisis el efecto de LOX-1/oxLDL sobre la activación de la vía NF-κB se midió la expresión de la fosforilación de IkB luego de 60 minutos de tratamiento con 50 µg/mL de oxLDL. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (**p≤ 0.001, **p≤0.01, *p≤0.05) con un n=3

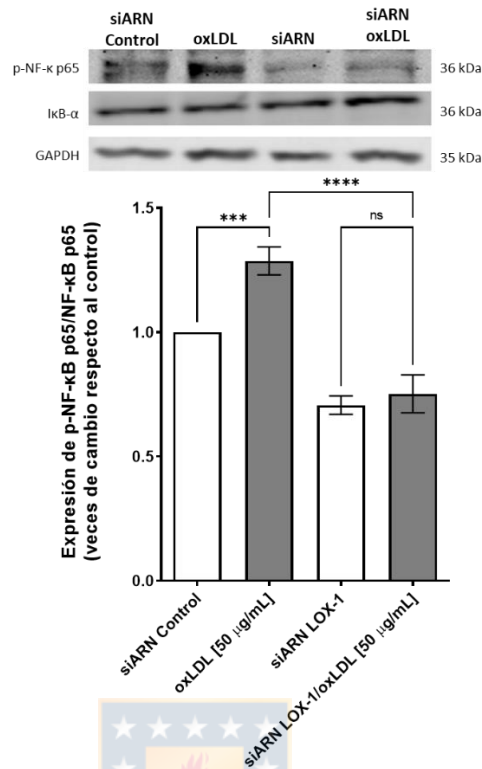


Figura 10: Expresión de NF-κB subunidad p65 en células C4-2B y C4-2B con ARN de interferencia contra LOX-1 con y sin oxLDL, 60 minutos post tratamiento con oxLDL. Análisis del efecto de LOX-1/oxLDL sobre la activación de la vía NF-κB se midió la expresión de la fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB luego de 60 minutos de tratamiento con 50 μg/mL de oxLDL. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (**p≤0.001, *p≤0.01, *p≤0.05) con un n=3.

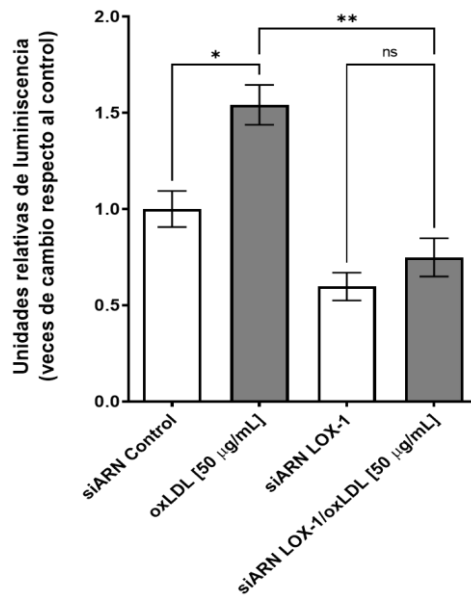


Figura 11: Activación de la vía NF-κB en células C4-2B y C4-2B con ARN de interferencia contra LOX-1 mediante actividad luciferasa. Células C4-2B con siARN control y con ARN de interferencia con un promotor mínimo de NF-κB, se trataron con 50 µg/mL de oxLDL por 24 horas. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (**p≤0.01, *p≤0.05) con un n=3.

8.4. LOX-1/oxLDL promueve la expresión de marcadores de resistencia, receptor de andrógenos (AR) y receptor de andrógenos variante 7(AR-V7).

A través de western blot se realizó la medición de expresión de AR y AR-V7, para esto se utilizaron células C4-2B transfectadas con siARN control o siARN contra LOX-1. Las cuales se trataron por 24 horas con oxLDL, para después extraer proteínas.

Tanto en el receptor de andrógenos y su isoforma, se puede observar un aumento significativo en su expresión al tratarse con oxLDL las células parentales. Por otra parte, aquellas células con LOX-1 silenciado tratadas con oxLDL, no presentan este aumento en la expresión del receptor de andrógenos, teniendo una disminución aproximada de un 62% respecto a las células control con oxLDL. Es posible observar que también AR-V 7 de éste tiene una disminución respecto a las células control con oxLDL, siendo su expresión aproximadamente un 64% menos cuando LOX-1 se encuentra silenciado.

Esto indica que existe una relación entre LOX-1/oxLDL y la expresión tanto de receptor de andrógenos como de sus variantes, específicamente AR-V7, la cual es un marcador de resistencia hacia enzalutamida.

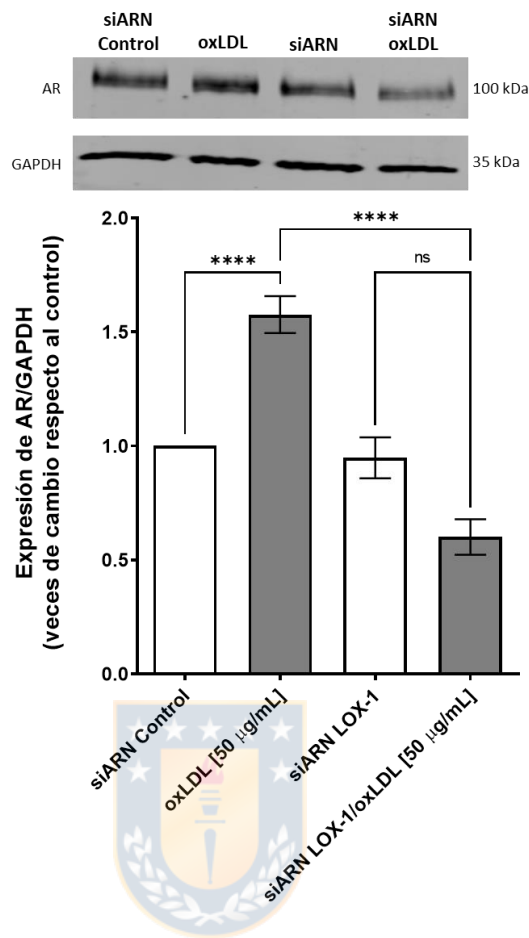


Figura 12: Expresión de receptor de andrógenos (AR) en células C4-2B con LOX-1 silenciado. Análisis mediante western blot de la expresión de AR posterior a 24 horas de tratamiento con 50 µg/mL de oxLDL. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (**p≤ 0.001, **p≤0.01, *p≤0.05) con un n=3

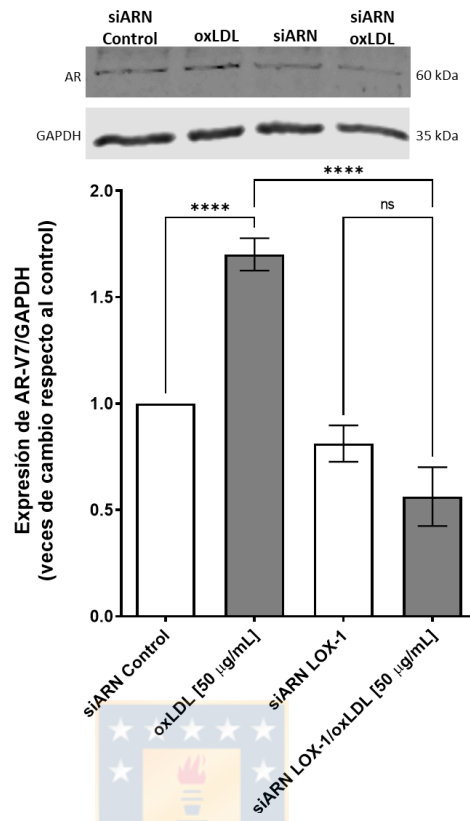


Figura 13: Expresión de receptor de andrógenos variante 7 (AR-V7) en células C4-2B con LOX-1 silenciado. Análisis mediante western blot de AR-V7 posterior a 24 horas de tratamiento con 50 µg/mL de oxLDL. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (**p≤ 0.001, **p≤0.01, *p≤0.05) con un n=3.

8.5. Efecto de oxLDL sobre la citotoxicidad de enzalutamida.

El efecto de la oxLDL sobre la citotoxicidad de enzalutamida se realizó mediante ensayos en placa de 96 pocillos, para esto se utilizaron células C4-2B y células C4-2B con ARN de interferencia contra LOX-1, las cuales se pretrataron por 24 horas con oxLDL y luego con una dosis de 20 μ M de enzalutamida.

De acuerdo con la figura 14, la viabilidad celular al tratar con oxLDL las células C4-2B aumentó 1,6 veces respecto a aquellas tratadas solo con enzalutamida. Por otra parte, las células tratadas con ARN de interferencia contra LOX-1, no presentan diferencia en la viabilidad respecto al control con enzalutamida. Las células tratadas con siARN contra LOX-1, oxLDL y enzalutamida, presentan una viabilidad un 87% menor que las células parentales tratadas con oxLDL y enzalutamida. Esto último podría establecer que los efectos de resistencia son mediados por LOX-1/oxLDL.

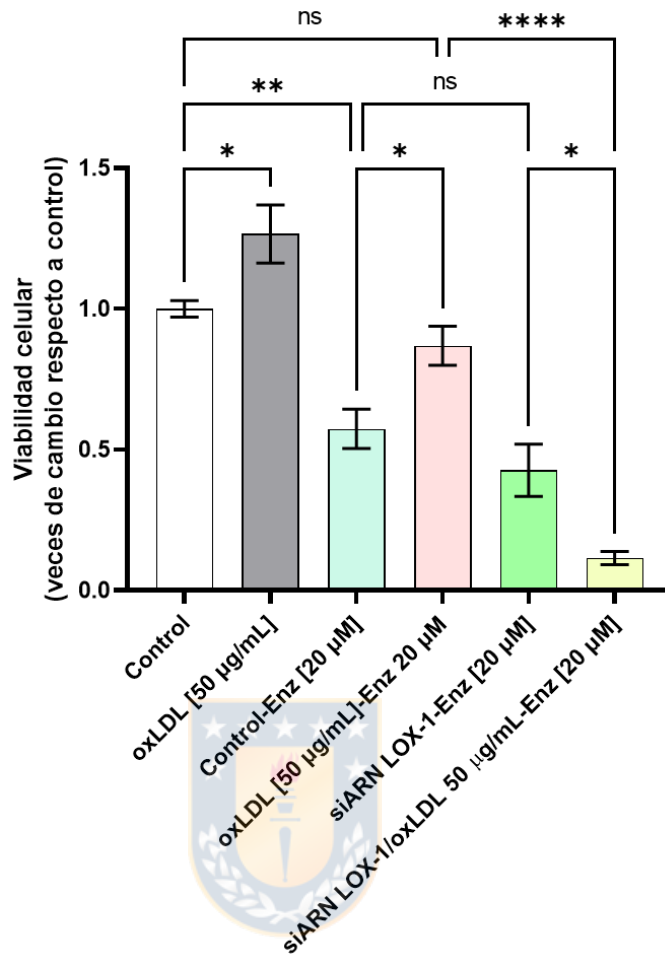


Figura 14: Efecto de oxLDL 50 µg/mL en la citotoxicidad de enzalutamida en dosis de 20 µM en células C4-2B con siARN control y siARN contra LOX-1. Para comprobar si la resistencia a enzalutamida es mediada por LOX-1, se trataron células C4-2B con dosis de 20 µM de enzalutamida y con 50 µg/mL de oxLDL, de esta manera se pudo observar el efecto de esta última sobre la citotoxicidad de enzalutamida. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (*** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$) con un $n=3$.

8.6. Purificación de dihidromiricetina y quercetina desde *Maytenus disticha*.

En la figura 15, se muestra el espectro obtenido desde el sólido blanco obtenido en la fracción 9 de *M. disticha*, utilizando como solvente acetona. En este espectro se muestran seis tipos de protones (a – f). por otra parte, también se analizaron los espectros bidimensionales de COSY, HSQY y HMBC, los cuales ayudan a identificar la molécula en estudio.

En la figura 16, se muestra el espectro obtenido desde el sólido amarillo obtenido en la fracción 10 de *M. disticha*, utilizando como solvente acetona. En este espectro se muestran cinco tipos de protones (a – e). por otra parte, al igual que con dihidromiricetina, en este caso también se analizaron los espectros bidimensionales de COSY, HSQY y HMBC, para identificar la molécula en estudio.

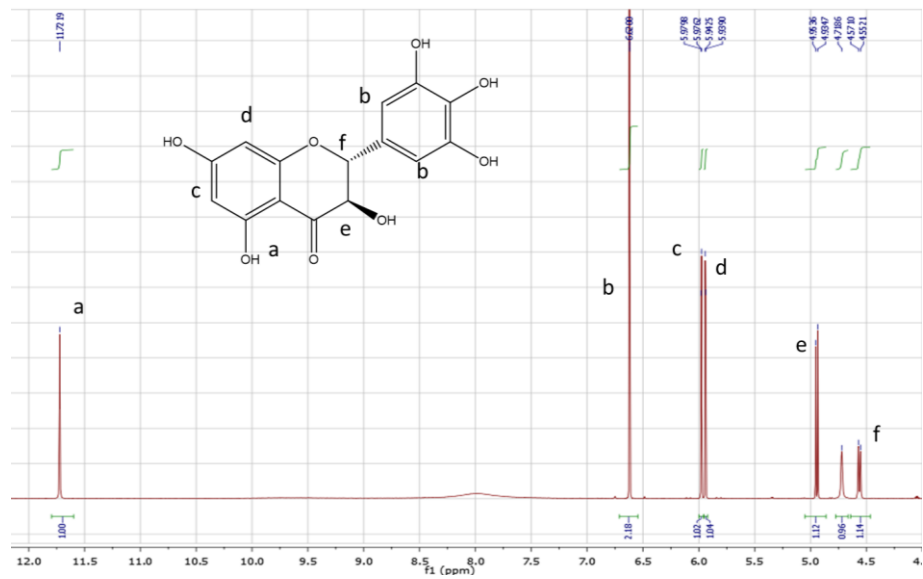


Figura 15: Espectro de dihidromiricetina 1H-RMN 600 MHz en acetona-d6. El compuesto fue aislado desde la purificación de la fracción 9 del extracto total de *M. disticha*.

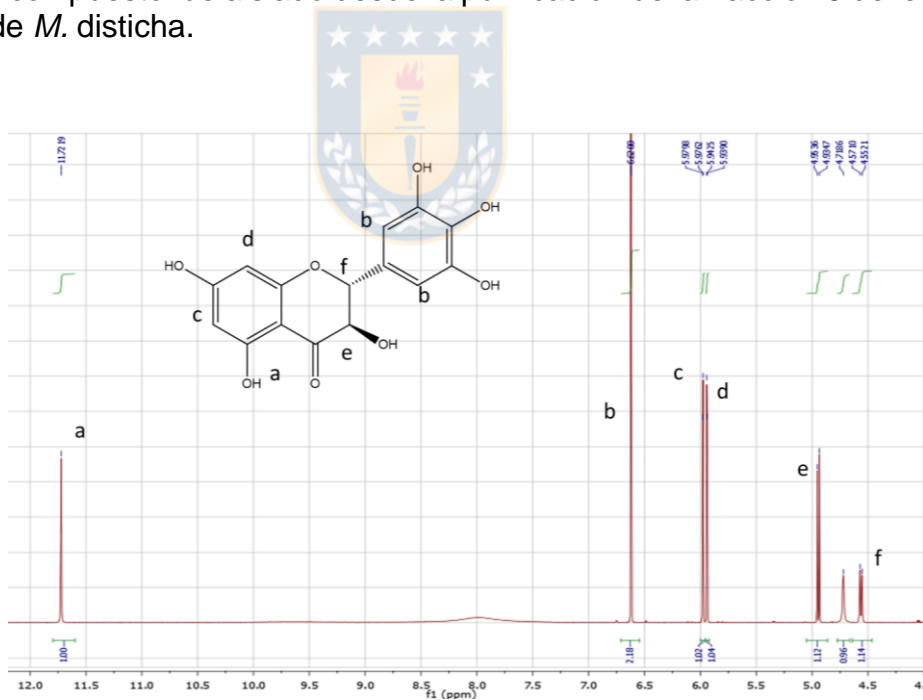


Figura 16: Espectro de quercetina 1H-RMN 600 MHz en acetona-d6. El compuesto fue aislado desde la purificación de la fracción 10 del extracto total de *m. disticha*.

8.7. Efecto de *Maytenus disticha*, dihidromiricetina y quercetina sobre la generación de ROS inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B.

De acuerdo con lo que se obtiene desde la figura 17, el extracto total de *M. disticha* no presenta ningún efecto en la generación de ROS en este modelo celular, teniendo un comportamiento similar al control. Quercetina tiene una prevención tanto en la generación de ROS basal como al comparar con oxLDL, siendo esta última de un 23,4% aproximadamente. Dihidromiricetina, por el contrario, produjo un aumento en la generación de ROS, siendo éste de 1,3 veces más que aquellas células tratadas solo con oxLDL. Al comparar la capacidad antioxidante tanto del extracto total como las moléculas con trolox, todas tienen una menor capacidad, dado que trolox previene la generación de ROS por debajo del rango basal para ambas condiciones.

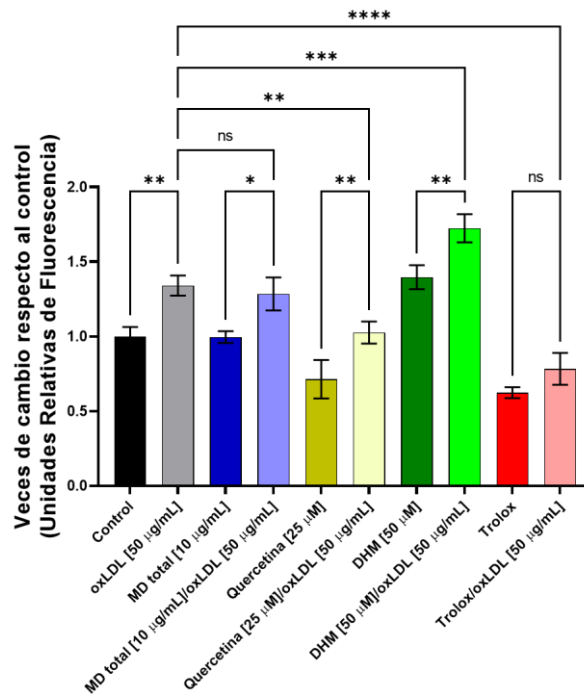


Figura 17: Análisis generación de ROS en células C4-2B, tratadas con Extracto total de *M. disticha*, dihidromiricetina, quercetina y trolox, estimuladas con oxLDL por 180 minutos. La generación de especies reactivas de oxígeno inducida por oxLDL, se comparó utilizando células C4-2B tratadas con 50 µg/mL de oxLDL en cotratamiento con extracto total de *M. disticha*, dihidromiricetina 50 µM y quercetina 25 µM, además de utilizar como control de actividad antioxidante trolox 25 µM, midiendo la oxidación de la sonda CM-H₂DCFDA a igual tiempo. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (**p ≤ 0.001, **p ≤ 0.01, *p ≤ 0.05) con un n=3.

8.8. Efecto de *Maytenus disticha*, dihidromiricetina y quercetina sobre la activación de NF- κ B inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B.

El tratamiento con oxLDL generó un aumento en la relación p-I κ B/I κ B en 1,3 veces respecto al control sin tratamiento (figura 18). Sin embargo, este efecto se previno al hacer un cotratamiento con extracto total de *M. disticha*, quercetina y dihidromiricetina. *M. disticha*, previno la fosforilación de I κ B en un 30,5%, quercetina en aproximadamente un 54,7%, dihidromiricetina la previno en un 70,3% aproximadamente.

Como se puede observar en la figura 19, los tratamientos con extracto total de *M. disticha*, quercetina y dihidromiricetina, previnieron la fosforilación de NF- κ B. La expresión de p-NF- κ B mostró que, al tratar las células con oxLDL existía un aumento en la fosforilación de la subunidad p65 en un 55,6%, lo que está asociado a la activación de la vía. De igual forma que con I κ B, el extracto total de *M. disticha*, presenta una prevención de ésta de aproximadamente un 45,5%. Quercetina previno la fosforilación de p65 en un 45,5% (comparado con las células con oxLDL). En el caso de dihidromiricetina 50 μ M, este compuesto previno la fosforilación de p65 en un 47,4%.

De acuerdo con el gráfico de la figura 20, el extracto total de *M. disticha*, previno la expresión de AR aproximadamente en un 42,2%. Quercetina previno la expresión de AR inducida por oxLDL en un 85% aproximadamente. Incluso, se puede ver un efecto sobre el nivel basal de AR, ya que en el control sin oxLDL disminuye en un 78% aproximadamente. En cambio,

dihidromiricetina produjo un aumento en la expresión de AR del 110% aproximadamente.

Para AR-V7 (figura 21), se obtuvo que el extracto total de *M. disticha*, no presentó una diferencia significativa en su expresión al tratar con oxLDL. Quercetina previno la expresión de AR-V7 inducida por oxLDL en un 30% aproximadamente. Dihidromiricetina, al igual que el extracto total, no produjo una diferencia en la expresión de AR-V7 comparado con el tratamiento con oxLDL



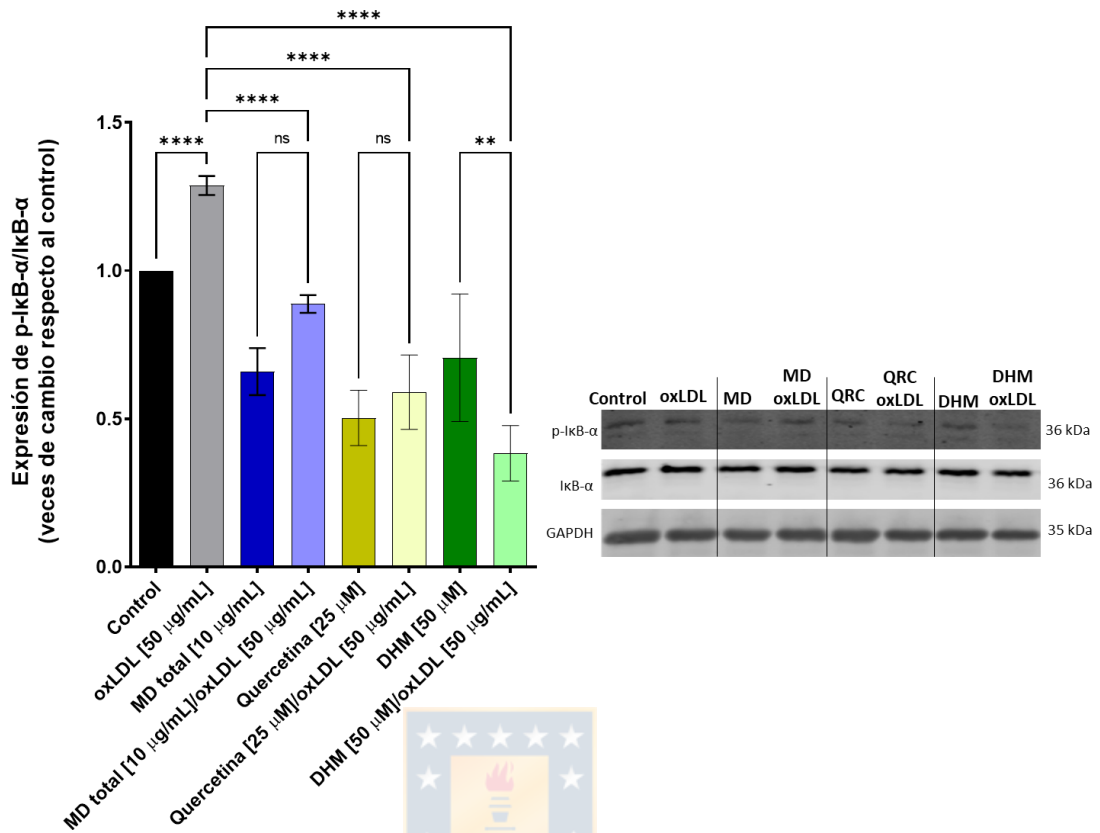


Figura 18: Expresión de IκB fosforilados en células C4-2B tratadas con 50 μg/mL de oxLDL por 1 hora, junto con extracto total de *M. disticha*, quercetina y dihidromiricetina. Izquierda, gráfico de expresión de IκB fosforilado con los diferentes tratamientos. Derecha western blot de la fosforilación de de IκB. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (**p≤ 0.001, **p≤0.01, *p≤0.05) con un n=3.

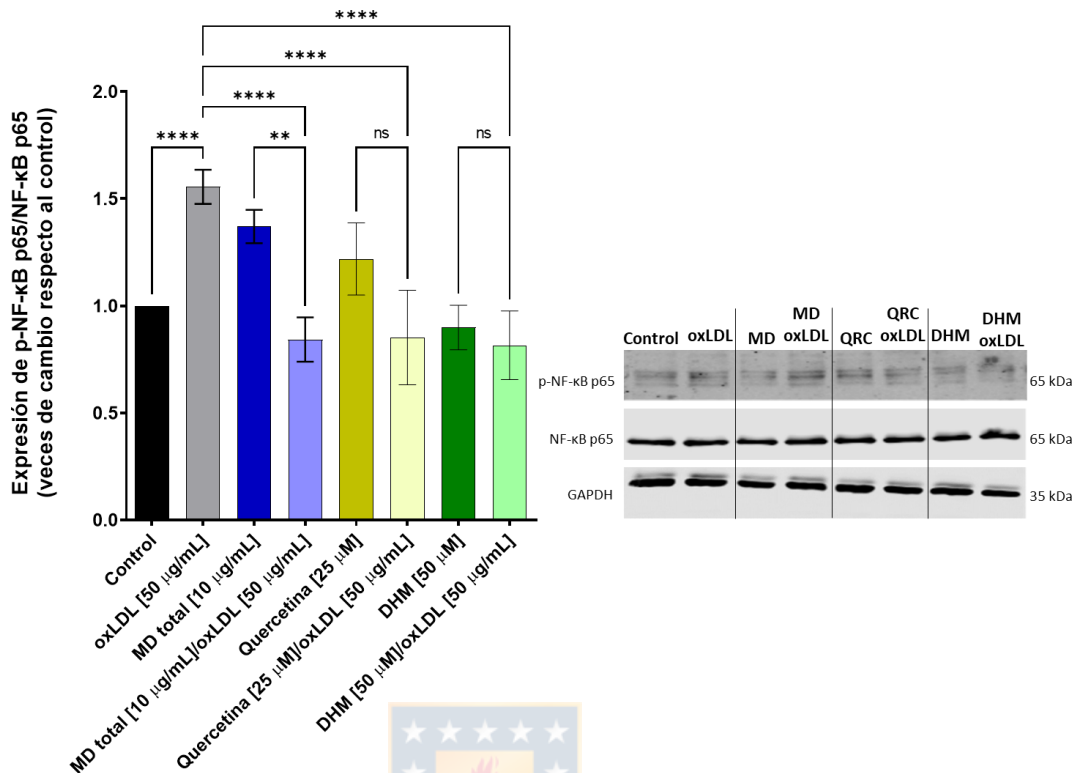


Figura 19: Expresión de p-NF-κB p65 en células C4-2B tratadas con 50 μg/mL de oxLDL por 1 hora, en co-tratamiento con extracto total de *M. disticha*, quercetina y dihidromiricetina. Análisis de la prevención de la expresión de p-NF-κB p65 con tratamientos de 1 hora de oxLDL con compuestos extraídos desde *M. disticha* (izquierda). Western blot expresión de p-NF-κB p65 con tratamientos de 1 hora de oxLDL con compuestos extraídos desde *M. disticha* (derecha). Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$) con un $n=3$.

8.9. Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la expresión de AR y AR-V7 inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B.

De acuerdo con el gráfico de la figura 20, el extracto total de *M. disticha*, previno la expresión de AR aproximadamente en un 42,2%. Quercetina previno la expresión de AR inducida por oxLDL en un 85% aproximadamente. Incluso, se puede ver un efecto sobre el nivel basal de AR, ya que en el control sin oxLDL disminuye en un 78% aproximadamente. En cambio, dihidromiricetina produjo un aumento en la expresión de AR del 110% aproximadamente.

Para AR-V7 (figura 21), se obtuvo que el extracto total de *M. disticha*, no presentó una diferencia significativa en su expresión al tratar con oxLDL. Quercetina previno la expresión de AR-V7 inducida por oxLDL en un 30% aproximadamente. Dihidromiricetina, al igual que el extracto total, no produjo una diferencia en la expresión de AR-V7 comparado con el tratamiento con oxLDL.

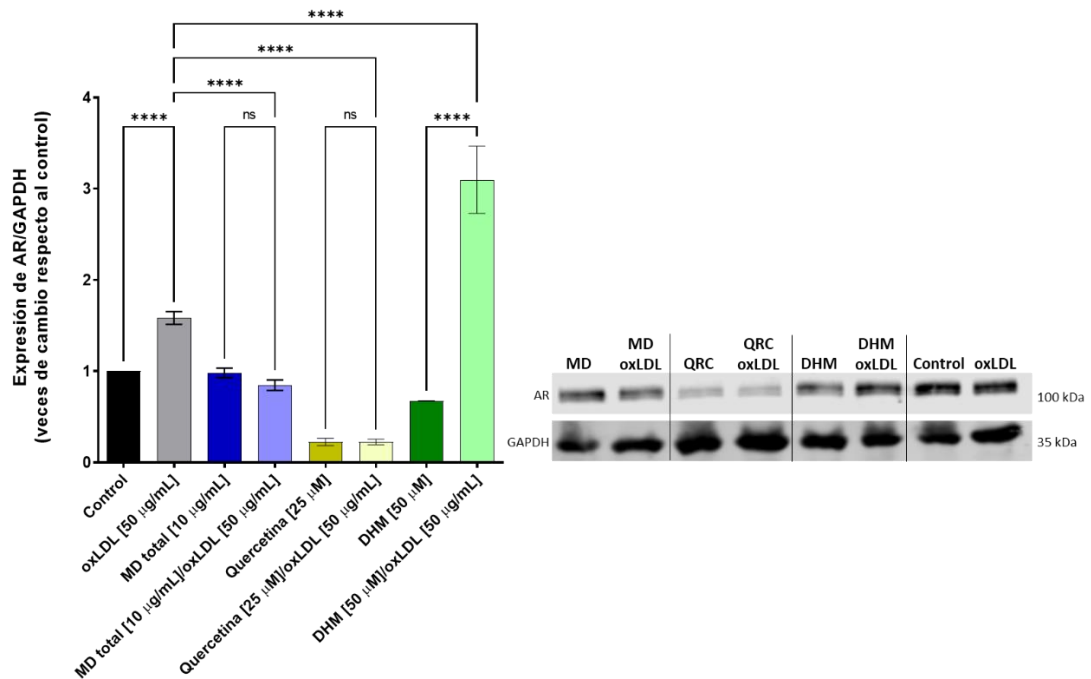


Figura 20: Expresión de AR en células C4-2B tratadas con 50 µg/mL de oxLDL por 24 horas, junto con extracto total de *M. disticha*, quercetina, dihidromiricetina. Expresión de AR respecto a GAPDH en células C4-2B (izquierda). Western blot de expresión de AR al tratar células C4-2B con compuestos extraídos a partir de *M. disticha* (derecha). Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (***p≤ 0.001, **p≤0.01, *p≤0.05) con un n=3.

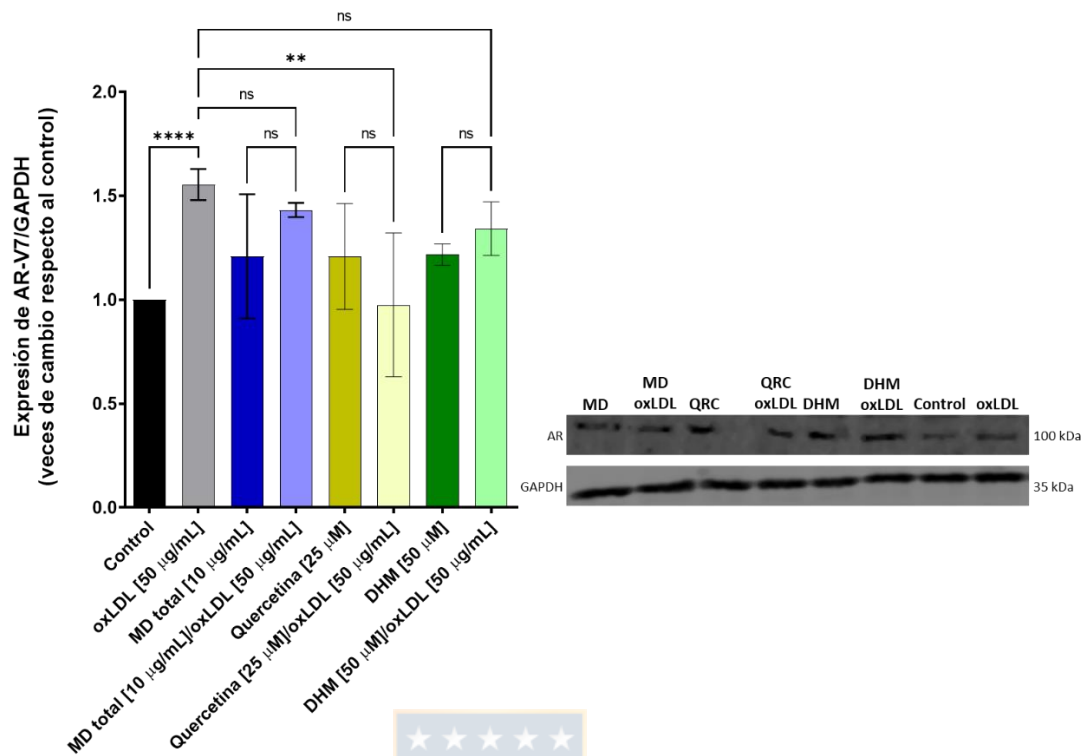


Figura 21: Expresión de AR-V7 en células C4-2B tratadas con 50 µg/mL de oxLDL por 24 horas, junto con extracto total de *M. disticha*, quercetina, dihidromiricetina. Expresión de AR-V7 respecto a GAPDH en células C4-2B (izquierda). Western blot de expresión de AR-V7 al tratar células C4-2B con compuestos extraídos a partir de *M. disticha* (derecha). Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$) con un $n=3$.

8.10. Quercetina y no dihidromiricetina previenen lo efectos de LOX-1/oxLDL en la citotoxicidad de enzalutamida en células C4-2B.

En la figura 22 se puede observar la comparación en la viabilidad de células C4-2B tratadas con oxLDL, enzalutamida y las moléculas en estudio a una dosis de 20 μ M de droga. Cuando se ve el efecto de la dosis de enzalutamida, existe un aumento en la viabilidad de 1,56 veces al pretratar las células con oxLDL. Al comparar las células tratadas con dihidromiricetina y oxLDL con aquellas tratadas con oxLDL, no existe una diferencia significativa en la viabilidad celular. En cambio, al comparar las células pretratadas con oxLDL y aquellas con oxLDL y quercetina, se obtiene que hay una disminución de la viabilidad celular de un 90% aproximadamente. Esto podría posicionar a quercetina como un potencial adyuvante para el tratamiento con enzalutamida en cáncer de próstata resistente a castración

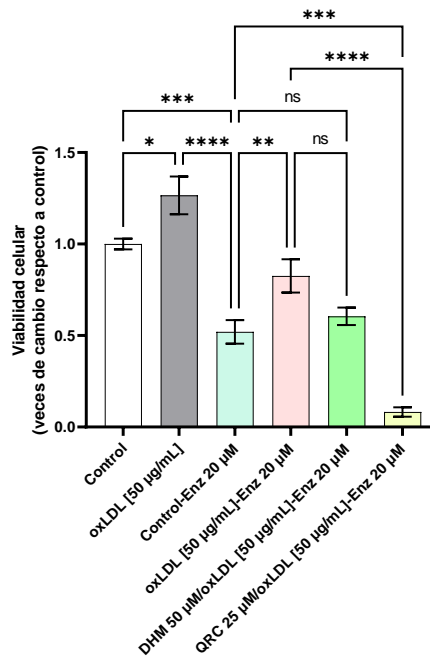


Figura 22: Viabilidad de células C4-2B tratadas con 25 µM de dihidromiricetina, 50 µM de quercetina y 50 µg/mL de oxLDL por 24 horas, además de tratamiento de 20 µM de enzalutamida. Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la viabilidad de células C4-2B tratadas con oxLDL 50 µg/mL, a una dosis de 20 µM de enzalutamida. Se evaluó la significancia mediante test ANNOVA con un post-test de Dunnet (p≤ 0.001, **p≤0.01, *p≤0.05) con un n=3.**

9. DISCUSIÓN

Debido a la importancia que existe en el tratamiento temprano y eficaz del cáncer avanzado, toma relevancia la búsqueda de compuestos que tengan una actividad adyuvante para prevenir los efectos de la resistencia a drogas. Es por eso que se planteó la hipótesis de que los flavonoides dihidromiricetina y quercetina previenen el desarrollo de resistencia a enzalutamida, inducida por LOX-1/oxLDL a través de la prevención de la activación de la vía NF-κB. En la presente tesis, se evaluó el rol de LOX-1/oxLDL en la resistencia a enzalutamida y se utilizaron los flavonoides dihidromiricetina y quercetina, obtenidos desde *M. disticha* pueden prevenir este efecto a través de la prevención de generación de ROS y la inactivación de la vía NF-κB. Nuestros resultados demostraron que el receptor LOX-1 y su activación por oxLDL promueve la formación de ROS y la activación de la vía NF-κB, generando un aumento en la expresión de los principales marcadores de resistencia a enzalutamida tales como AR y AR-V7, lo cual indujo una disminución en la citotoxicidad de enzalutamida en presencia y ausencia del receptor LOX-1 y oxLDL.

Posteriormente evaluamos los flavonoides obtenidos desde *M. disticha*, dihidromiricetina y quercetina, para la prevención de formación de ROS y la inactivación de la vía NF-κB y así de esta forma prevenir la expresión de los marcadores de resistencia a enzalutamida.

De estos ensayos se logró determinar qué, sólo quercetina tiene actividad en la prevención de ROS, por el contrario, dihidromiricetina genera un aumento

en la formación de ROS en la concentración de estudio utilizada (50 μ M), el extracto total de *M. disticha* de 10 μ g/mL no genera prevención en la generación de ROS.

Respecto a la inactivación de la vía de NF- κ B, se determinó que tanto el extracto total, como sus compuestos derivados, dihidromiricetina y quercetina, previenen la activación de esta vía de señalización.

Respecto a los principales marcadores de resistencia a enzalutamida, pudimos comprobar que el extracto total y principalmente quercetina, generan un efecto en la prevención de la expresión de AR, sin embargo, dihidromiricetina, potencia el efecto de oxLDL sobre la expresión de éste. En la expresión de AR-V7, nuevamente quercetina, previene su expresión, por otra parte, el extracto total y dihidromiricetina no generan un efecto significativo en la prevención de la expresión de AR-V7.

9.1. Silenciamiento de LOX-1 con ARN de interferencia como una herramienta para la función de LOX-1 en el estudio de cáncer de próstata resistente a castración.

Una de las estrategias de biología molecular más utilizadas para inhibir parcialmente la expresión de una proteína es la utilización de siARN, en esta tesis esta fue la técnica utilizada para inhibir la expresión de LOX-1, obteniendo inhibiciones de aproximadamente un 50% de inhibición de proteína. El silenciamiento de LOX-1 ha sido reportado por varios autores, entre los cuales Nagelreiter *et al*, lograron hacer un *knockdown* de LOX-1 utilizando siARN en células SZ95, logrando observar que este *knockdown* influye en la expresión de diversos genes, incluyendo aquellos que participan

en la mitosis (Nagelreiter et al., 2018). Hirsh y colaboradores, demostraron que al utilizar inyecciones de siARN en liposomas contra LOX-1 se logró disminuir su expresión en modelos de *xenograft* de células humanas de cáncer de próstata y de mama, obteniendo como resultado la disminución en la migración celular y la reducción de tamaño tumoral (Hirsch et al., 2010). En astrocitomas, se logró un *knockdown* de LOX-1 con siARN de un 80% posterior a siete días desde la transfección (Da Silva et al., 2015). Itoh *et al*, utilizaron siARN contra LOX-1 en células microgliales, logrando disminuir la expresión del receptor. En investigaciones anteriores, la utilización de siARN contra LOX-1 en líneas celulares de cáncer de próstata resistente a castración, implicó una disminución en la expresión del receptor entre un 40% - 50%, lo que llevó a demostrar que LOX-1/oxLDL, son relevantes en la transición epitelio mesenquimal, potencial tumorigénico y crecimiento tumoral en CRPC (González-Chavarría et al., 2018). Nuestros resultados, en conjunto con los resultados de otros autores nos permiten concluir que la utilización de siARN es una herramienta válida para demostrar la función de LOX-1/oxLDL en la resistencia a enzalutamida en modelos CRPC

9.2. LOX-1/oxLDL promueve la generación de ROS en células CRPC

Nuestros resultados demostraron que el receptor LOX-1 al ser activado por oxLDL aumenta la generación de ROS de forma significativa, estos resultados son concordantes con lo que ha sido demostrado en literatura por otros autores. Pérez *et al* comprobaron el aumento de ROS mediado por LOX-1/oxHDL en células HUVEC y HAEC (ambos modelos endoteliales humanos) (Pérez et al., 2019). Cominacini *et al*, demostraron que en células BAEC la

activación de LOX-1 por oxLDL promueve la formación de H_2O_2 y O_2^- , siendo estas ROS las moléculas que principalmente se generan en una célula al activarse el complejo NADPH oxidasa (Cominacini et al., 2000). En células endoteliales (CE), oxLDL produce un aumento de 2 veces en la producción de ROS, en comparación con LDL nativa (X. ping Chen et al., 2007). En la misma línea, Khaidakov y Mehta, demostraron que al tratar con oxLDL células epiteliales de mama MCF10A, aumenta la expresión de receptores *scavenger*, como el receptor LOX-1, SRA1 y CD36, además se observó un aumento en la expresión de las subunidades P22^{phox} y P47^{phox} de NADPH oxidasa (Khaidakov & Mehta, 2012). Interesantemente, cuando se utilizan compuestos que reducen los niveles de actividad de NADPH oxidasa, como la coenzima Q10, es posible reducir la generación de ROS inducida por oxLDL. En este sentido, se ha descrito que las principales ROS inducidas por oxLDL a través de la activación de NADPH oxidasa son anión superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y radical hidroxilo. Se ha descrito que el aumento en O_2^- intracelular actúa como mediador de retroalimentación positiva en la expresión de LOX-1 (Lubrano & Balzan, 2014). Lu *et al* señalan que ROS genera una regulación positiva en la transcripción de LOX-1 y que este último a su vez genera un aumento en la generación de ROS (J. Lu et al., 2011). Wu *et al*, por otra parte, demuestran una relación entre oxLDL y el incremento de ROS, al tratar la línea de macrófagos de ratón RAW264.7 con 80 $\mu\text{g/mL}$, aumento que es inhibido por el antioxidante androgafólido (J. Lu et al., 2011). Por su parte, Vacaresse *et al*, demuestran que existe una relación entre los tratamientos con oxLDL y la producción de ROS en células de la línea humana

ECV-304, la cual se previene con la utilización de antioxidantes como trolox y ácido cafeico (Vacaresse et al., 2001). Esta generación de ROS tiene como consecuencia la activación de vías de señalización como NF- κ B por los mecanismos mencionados en la introducción (Takada et al., 2003).

9.3. LOX-1/oxLDL promueve la activación de NF- κ B en células C4-2B

NF- κ B es una vía de señalización importante en la función del sistema inmune y en procesos patológicos como la inflamación, aterosclerosis, disfunción endotelial y cáncer. Esta vía puede ser activada por TNF- α , LPS y también por ROS, como se describió en la sección de introducción. Nuestros resultados demostraron que la activación de LOX-1 por oxLDL produce una activación de NF- κ B mediante la fosforilación activadora de la subunidad p65, I κ B- α y también se demostró un aumento en su actividad transcripcional mediante actividad de reportero luciferasa. Estos resultados son concordantes con lo demostrado por diversos estudios en patologías como el cáncer, aterosclerosis y disfunción endotelial.

Una de las patologías en las que más se ha descrito la activación de NF- κ B mediada por LOX-/oxLDL es la aterosclerosis. Cabe destacar que la activación de NF- κ B mediada por LOX-1 mediante oxLDL es crucial para aumentar la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas, como las selectinas E y P, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la MCP-1, que son cruciales para el inicio de la adhesión de monocitos a la CE, lo cual es un proceso importante en la disfunción endotelial e inicio de la aterosclerosis. Esto fue corroborado por un estudio que demuestra que el silenciamiento de LOX-1 da lugar a una

inhibición significativa en los genes diana de NF- κ B, como VCAM-1 (Xu et al., 2013). También se ha descrito que tras la unión de oxLDL a LOX-1 en CE, se induce generación de ROS, activando así a NF- κ B, pero inactivando el NO, esencial para la vasodilatación (Cominacini et al., 2000, 2001). Como la oxLDL es un potente activador de NF- κ B y considerando que se ha descrito que hay sitios putativos de unión a NF- κ B localizados en el promotor del gen LOX-1, es razonable que la unión de oxLDL con LOX-1 pueda resultar en la activación de NF- κ B sensible a redox a través de las vías de señalización NADPH oxidasa-ROS, generando un *feedback* positivo en la generación de ROS y sobreexpresión del receptor LOX-1 (Anrather et al., 2006). La activación del NF- κ B puede inducir la regulación de los mediadores proinflamatorios como, IL-6, IL-1 β , TNF α y puede promover la expresión de receptores de angiotensina como AT1R (Schmeisser et al., 2004) además del propio LOX-1, que a su vez aumentan la captación de oxLDL mediada por LOX-1, amplificando así los efectos de las oxLDL en la progresión de la aterosclerosis. En cáncer gástrico (células HGC-27), se ha determinado que la interacción entre LOX-1/oxLDL aumenta la activación de NF- κ B, promoviendo la expresión y secreción de VEGF-C, lo que puede promover la metástasis linfática del cáncer gástrico (Caiqi et al., 2019). Hirsch obtuvo que al inhibir la expresión de LOX-1, existe una prevención de la activación de NF- κ B, factor que está asociado a la transformación celular, por lo que se previene esta transformación (Hirsch et al., 2010). Esto es comprobado además con el uso de antagonistas de LOX-1 e inhibidores de NF- κ B.

En células de epitelio mamario, tratamientos de 20 µg/mL de oxLDL producen un aumento en la fosforilación de IκB de 2 veces respecto al control y la subunidad p65 tiene un aumento de 1,4 veces (Khaidakov & Mehta, 2012). De igual manera un silenciamiento de LOX-1, genera una disminución en la fosforilación de IκB, además de disminuir genes relacionados con proliferación celular y migración en células de cáncer de mama HCC1143 (Khaidakov et al., 2011).

Además, se ha descrito que oxLDL promueve la activación de vías de señalización relacionadas con el incremento del potencial tumorigénico como son las vías asociadas a β-catenina, NF-κB, STAT1 y STAT3 en células de cáncer de próstata PC3 (Wan et al., 2015).

9.4. LOX-1/oxLDL promueve la expresión de marcadores de resistencia, receptor de andrógenos (AR) y receptor de andrógenos variante 7(AR-V7) y efecto de LOX-1/oxLDL sobre la citotoxicidad de enzalutamida

En el contexto del CRPC, se ha descrito que NF-κB puede mediar la expresión de proteína relacionadas con la resistencia a drogas como enzalutamida y abiraterona, como AR y AR-V7. Nuestros resultados indican que al tratar las células C4-2B con oxLDL, aumenta la expresión de AR y AR-V7 en un proceso mediado por el receptor LOX-1.

Si bien, no hay evidencia que relacione directamente LOX-1/oxLDL con la expresión de AR y/o AR-V7, si se ha demostrado que la activación de NF-κB, está implicada en la expresión de estos marcadores. En un modelo de hiperplasia prostática benigna, Austin, *et al* identificaron que NF-κB es

primordial en la progresión de esta patología prostática que puede derivar a cáncer de próstata. En este mismo estudio se demostró que la activación de NF-κB, incrementa significativamente en el ARNm de AR-V7 (Austin et al., 2016). En células CRPC LNCaP y 22Rv1, a las cuales se les sobre expresó AR y AR-V7, se observó un aumento en la activación de NF-κB, lo cual refleja que puede haber una retroalimentación positiva entre estos marcadores y la activación de la vía. Liu *et al* demostraron que la inhibición de NF-κB con melatonina previene la sobre expresión de AR y AR-V7 en este modelo de estudio. En modelos de castración, en los cuales se disminuye significativamente la concentración de DHT, y se ha demostrado un aumento en la activación de NF-κB evidenciada por la fosforilación de la subunidad p65 (V. W. S. Liu et al., 2017). Esto en modelos celulares de humano y ratón, induce además un incremento en la expresión de AR-V7, pero un aumento modesto en la expresión de AR, lo cual ha sido observado también en modelos de castración *in vivo* (Morel et al., 2021). Por otro lado, Nadiminty *et al*, demuestran que en células LNCaP, una línea sensible a andrógenos, que la sobre activación de la vía no canónica de NF-κB, mediada por la subunidad p52, también promueve la expresión de AR-V7 (Nadiminty et al., 2013). En células 22Rv1, Kiliccioglu *et al*, observan que al inhibir NF-κB con BAY 11-7082 y Hsp-27, posterior a 48 horas, existe una disminución en la expresión de AR-V7 y AR, reforzando la idea de que NF-κB es importante en la sobreexpresión de estos dos marcadores de resistencia a enzalutamida (Kiliccioglu et al., 2019). Es así como se ha reportado que el bloqueo de la vía de señalización de NF-κB en células C4-2B y 22Rv1 incrementa la

sensibilidad de estas células CRPC a antiandrógenos, efecto que se puede asociar a que la activación de la vía NF- κ B aumenta la expresión de AR y AR-V7 (X. Liu et al., 2009).

Con esta evidencia, es posible proponer que la expresión de AR y AR-V7 mediada por LOX-1/oxLDL, es resultado de la activación de la vía NF- κ B, en células C4-2B, sin embargo, es relevante plantear que estos efectos podrían ser directos por la activación de LOX-1/oxLDL o indirectos mediados por una sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6 dependiente de la activación de NF- κ B.

Desde esta perspectiva, aun cuando cualquiera de esto dos eventos pueda ser el responsable en la sobreexpresión de AR y AR-V7, la activación de LOX-1 debería por tanto inducir un aumento en el IC₅₀ de drogas que tienen como blanco a AR (enzalutamida, antagonistas de AR). Nuestros resultados demostraron que los tratamientos de oxLDL disminuyen la citotoxicidad de enzalutamida en dosis de 20 μ M, efecto que se previene cuando hay un *knockdown* de LOX-1, aún más, oxLDL mostró un efecto citotóxico en las células con menor cantidad de LOX-1. Esta dosis de enzalutamida es utilizada por diversos autores para el estudio de resistencia a esta droga (Khurana et al., 2016, 2017). Estos resultados, refuerzan la premisa de que la expresión de marcadores de resistencia está asociada a la activación de LOX-1 mediada por oxLDL. Lo cual es de gran relevancia desde el punto de vista clínico, debido a que enzalutamida es uno de los fármacos a utilizar en primera instancia al encontrarse un caso de CRPC. Entregando un blanco terapéutico

que puede optimizar el uso de la droga y evitar tanto la resistencia intrínseca como adquirida por parte del paciente.

9.5. Purificación de dihidromiricetina y quercetina.

La purificación de ambas moléculas se ha realizado eficientemente dado que son compuestos sólidos que han podido precipitar en solventes orgánicos una vez concentrada la fracción desde CC. La estructura de dihidromiricetina muestra un anillo central no conjugado, el cual origina una estructura tridimensional distinta que quercetina, la cual al poseer todos los carbonos hibridizados sp^2 muestra mayor planaridad y también conjugación electrónica que dihidromiricetina.

Estos flavonoides son moléculas muy estudiadas por sus capacidades farmacológicas, por ejemplo, quercetina muestra 527.000 resultados en Google Académico (búsqueda *quercetin*) y la dihidromiricetina entrega 7.820 resultados (búsqueda *dihydromyricetin*), lo cual muestra la gran relevancia de estos compuestos. Si bien estos compuestos han sido muy estudiados, los resultados que hemos podido mostrar incrementan su conocimiento y rol bioquímico de estas moléculas.

Para la identificación de dihidromiricetina, los seis tipos protones que se muestran, concuerdan con lo publicado por Chaturvedula y Huang, lo que demuestra que el sólido purificado efectivamente corresponde a dihidromiricetina (Chaturvedula et al., 2013).

En la identificación de quercetina, el espectro obtenido de 1H concuerda con lo descrito por Lallemand y Duteil (Lallemand & Duteil, 1977). Con esto, se

logra confirmar que el sólido amarillo obtenido mediante la purificación de la fracción 10 de *M. disticha*.

En Brasil se han aislado derivados de quercetina en distintas especies de *Maytenus*, principalmente sus formas glicosiladas (Leite et al., 2001; Vilegas et al., 1999). mismo perfil es descrito en *M. ilicifolia* por Diagone et al (Diagone et al., 2012).

9.6. Efecto de *Maytenus disticha*, dihidromiricetina y quercetina sobre la generación de ROS inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B

Con la finalidad de buscar inhibidores de la activación de NF- κ B o de estímulos que induzcan su activación, como las especies reactivas del oxígeno, se utilizaron compuestos obtenidos a partir de *M. disticha*. En esta especie demostramos que existen moléculas con actividad anticancerígena, como los β -dihidroagarofuranos, los cuales inducen la muerte celular por apoptosis en modelos *in vitro* de cáncer de pulmón, mama y próstata (González-Chavarría et al., 2020). De igual manera, se describió que esta planta posee también moléculas antioxidantes como la dihidromiricetina y la quercetina. El extracto total, junto con estas moléculas fueron utilizados para evaluar su capacidad en la prevención de la generación de ROS mediadas por LOX-1/oxLDL en células C4-2B. Nuestros resultados demostraron que el extracto total total de *M. disticha*, no previene los efectos de oxLDL en la formación de ROS en células en células C4-2B. En los tratamientos con dihidromiricetina no hubo una actividad antioxidante, por el contrario, se observó una actividad prooxidante y un efecto sinérgico en la generación de ROS mediada por

oxLDL. Sin embargo, los tratamientos con quercetina mostraron una actividad antioxidante en la generación basal de ROS y previno los efectos de oxLDL sobre la generación de ROS.

Análisis reportados por nuestro laboratorio, demostraron que el extracto total de *M. disticha*, no genera efecto sobre la formación de ROS en líneas celulares C4-2B, así como tampoco en células PC-9 (cáncer de pulmón) y MCF-7 (cáncer de mama) (González-Chavarría et al., 2020). Estos resultados pueden darse, debido a que el extracto total contiene una mezcla de varios compuestos, los que pueden ser tanto antioxidantes, como prooxidantes. Por otro lado, es posible que la concentración de compuestos con la actividad en cuestión (antioxidantes) sea baja para poder generar un efecto sobre la producción de ROS.

Los resultados obtenidos para dihidromiricetina, concuerdan con lo obtenido con que ésta es una molécula que induce autofagia en células epiteliales Cal27, debido a aumento de ROS (Fan et al., 2016). En líneas celulares de melanoma humano SK-MEL-28, DHM también produce apoptosis mediante aumento de ROS (Zhou et al., 2017). En células C4-2B ya habíamos observado un aumento de ROS general, además de un aumento en el estrés oxidativo mitocondrial por parte de dihidromiricetina (González-Chavarría et al., 2020). Por el contrario, en células de oído de ratón HEI-OC1 (H. Han et al., 2020) y en los macrófagos de ratón RAW264.7, dihidromiricetina previene la formación de ROS inducida por LPS (X. Zhang et al., 2018). Por lo cual, podríamos proponer que dihidromiricetina actúa aumentando o disminuyendo ROS, dependiendo del modelo celular y el agente inductor de ROS.

Por su parte, la molécula de quercetina ha sido descrita como un agente antioxidante, en células RAW264.7 previene la formación de ROS inducida por LPS (J. Tang et al., 2019), en células Hep-G2 previene la generación de ROS en tratamiento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxLDL. En células de glioma C6, previene la formación de ROS producida intrínsecamente por estas células (T. J. Chen et al., 2006). En células MCF-7 tanto quercetina como quercetina encapsulada mediante liposomas disminuyen la generación de ROS, inhibiendo la proliferación celular (Rezaei-Sadabady et al., 2016). Por el contrario, Shang *et al*, describen que en células de cáncer gástrico de la línea AGS, quercetina a una concentración de 100 μM produjo un aumento de 1.6 veces en la producción de ROS a 12 horas (Shang et al., 2018). En células de cáncer de próstata de las líneas LNCaP y PC-3 se produjo una disminución en la generación de ROS al tratar con 40 μM quercetina, efecto contrario al obtenido en células DU-145 (Ward et al., 2018). Los efectos sobre la producción de ROS en células de cáncer parecen ser dependientes de la concentración de quercetina, y la línea celular. Zhang, *et al*, al utilizar una dosis de 20 μM de quercetina en PC-3 aumenta los niveles de ROS (X. Zhang et al., 2020). Sin embargo, Zhang *et al*, una concentración de 25 μM de quercetina en células LoVo (cáncer de colon) no tiene efecto en la producción de ROS (H. Zhang et al., 2012), por el contrario, en células MCF-7 esta concentración aumenta la formación de ROS 2.5 veces respecto al control (Q. Wu et al., 2018; H. Zhang et al., 2012).

9.7. Efecto de *Maytenus disticha*, dihidromiricetina y quercetina sobre la activación de NF-κB inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B

Nuestros resultados muestran que el extracto total de *M. disticha*, dihidromiricetina y quercetina, previenen la activación de la vía NF-κB inducida por LOX-1/oxLDL.

En el género *Maytenus*, se han reportado diferentes metabolitos secundarios, como triterpenos, esteroides, flavonoides, entre otros, Veloso *et al*, al revisar diferentes bases de datos, reportan que la mayoría de las especies del género *Maytenus*, poseen metabolitos con actividad antiinflamatoria, procesos en los que NF-κB cumple un rol fundamental (Veloso et al., 2017).

Para dihidromiricetina, compuesto que tiene diferentes actividades biológicas, como actividad antiinflamatoria y anticancerígena, nuestros resultados concuerdan con los reportados por varios autores. En los procesos inflamatorios, se ha demostrado que esta molécula regula negativamente la expresión de NF-κB, en tratamientos sin estímulos activadores y previene la activación en ensayos con activación con lipopolisacáridos (LPS), teniendo como resultado una disminución del efecto inflamatorio. En un modelo de ratón con dieta alta en grasas, dihidromiricetina disminuye la fosforilación de la subunidad p65 inducida por LPS (D. Liu et al., 2019). En esta misma línea, Guo *et al*, demuestran que una dosis intravenosa de dihidromiricetina en ratones con hígado graso, genera una disminución en la actividad basal de NF-κB en los hepatocitos de estos ratones (Guo et al., 2019). Tang *et al*, al utilizar dihidromiricetina en células HeLa, señalan que disminuye la

fosforilación de I κ B inducida por TNF- α (N. Tang et al., 2016). En células microgliales de ratón BV2, tratamientos entre 10 – 50 μ M de dihidromiricetina, previenen la fosforilación de I κ B inducida por LPS (Weng et al., 2017). En macrófagos de ratón, RAW264.7, Hou *et al*, demuestran que la utilización de dihidromiricetina disminuye la fosforilación de I κ B y la fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B (Hou et al., 2015). Similar es lo descrito por Li *et al*, en células CNE-2 (modelo de carcinoma nasofaríngeo), con la utilización de 120 μ g/mL de dihidromiricetina por 24 horas se logra generar una inhibición en la fosforilación de I κ B posterior a 30 minutos de tratar con TNF- α , también informan que este compuesto bloquea la subunidad p65 (C.-H. Li et al., 2021). Han *et al*, demuestran que la utilización de 50 y 100 μ M de dihidromiricetina, previene la fosforilación de p65 a 24 y 48 horas post tratamiento en líneas celulares de leucemia (HL60 y K562) (J. M. Han et al., 2021). En contraparte, Zhou et al, al utilizar 100 μ M de dihidromiricetina en células de melanoma humano (SK-MEL-28), demuestran que provoca autofagia inducida por activación de NF- κ B (J. M. Han et al., 2021).

Nuestros resultados obtenidos respecto del efecto de quercetina en la prevención de los efectos de LOX-1 sobre la activación de NF concuerdan con lo obtenido por Cheng *et al*, quienes informan que un tratamiento de 20 μ M de quercetina en células ARPE-19, modelo de célula epitelial humano, previene tanto la fosforilación de I κ B y la subunidad p65 de NF- κ B inducida por IL-1 β posterior a 60 minutos de tratamiento (Cheng et al., 2019). En otros modelos endoteliales, células HUVEC, quercetina inhibe la activación de NF- κ B inducida por TNF- α (T. Chen et al., 2020). En modelo murino de prostatitis,

Meng *et al*, demuestran que dosis entre 50 – 200 mg de quercetina previenen la fosforilación de la subunidad p65 (Meng *et al.*, 2018). García-Roman *et al*, indican que en la etapa de promoción de la hepatocarcinogénesis química inducida por N-nitrosodietilamina, la utilización de quercetina disminuye los niveles de traslocación nuclear que NF- κ B, aunque no genera una disminución significativa en la fosforilación de I κ B α (García-Roman *et al.*, 2008). En células de hepatoma humano Hep-G2, quercetina previene la traslocación nuclear de NF- κ B, además de prevenir la fosforilación de I κ B, de acuerdo con lo reportado por Granado-Serrano *et al* (Granado-serrano *et al.*, 2010). En células de cáncer de colon CACO-2 y SW-620, dosis de quercetina entre 25 y 100 μ M disminuyen las fosforilaciones de I κ B y p65, además de disminuir la unión de NF- κ B al ADN luego de 6 horas de tratamiento en una relación dosis-dependiente (X. A. Zhang *et al.*, 2015), lo que se traduce en un aumento en la apoptosis de estas células. En células de cáncer de pulmón A549, Wu *et al* demuestran que tratamientos de 2 y 5 μ M previenen la activación de la vía NF- κ B inducida por NiCl₂, un agente carcinogénico en este tipo de cáncer (T. C. Wu *et al.*, 2018). Senthilkumar *et al*, demuestran que en la línea celular de cáncer de próstata PC-3, tratamientos de 50 y 100 μ M disminuyen la expresión de NF- κ B (Senthilkumar *et al.*, 2011). Algo similar, fue obtenido por Bath *et al*, quienes utilizan EGF como inductor de actividad NF- κ B en células PC-3, sin embargo, la utilización de quercetina previene esta activación (Bhat *et al.*, 2014). En modelo de osteoartritis de ratón (proceso inflamatorio asociado a la activación de NF κ B), dosis de 1, 5 y 10 mg/kg de quercetina se disminuye la expresión basal de NF- κ B, disminuyendo el proceso inflamatorio

asociado a la patología (J. Zhang et al., 2019). Chekalina *et al*, demuestran que, al administrar una dosis de 120 mg diarios de quercetina a un grupo de pacientes con arteriopatía coronaria, se reduce el ARNm de I κ B α en un 64,8% aproximadamente, lo que conlleva a una disminución en la actividad transcripcional de NF- κ B y la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β (Chekalina et al., 2018).

9.8. Efecto de dihidromiricetina y quercetina sobre la expresión de AR y AR-V7 inducida por LOX-1/oxLDL en células C4-2B

Nuestros resultados mostraron que el extracto total de *M. disticha* y quercetina previenen la expresión de AR, por el contrario, dihidromiricetina aumenta la expresión de este marcador de resistencia a enzalutamida. Es importante destacar que la sobreexpresión de AR, puede ser mediada por diferentes vías de señalización asociadas a cáncer de próstata resistente a castración, como la activación de NF- κ B, vías MAP kinasa, PI3 kinasa, AKT y su auto regulación por *feedback* positivo (Kono et al., 2017).

En este sentido, Ha *et al*, demuestran que la aplicación de un inhibidor de AKT, en líneas celulares de cáncer de próstata dependientes de andrógenos, disminuye la expresión de AR (Ha et al., 2011).

Shabbir *et al*, en un estudio de *Maytenus roykeanus*, disminuye la expresión de AR en células C4-2 y CWR22Rv1, además de tener un efecto similar en modelo *in vivo* (Shabbir et al., 2015). De Oliveira *et al*, evaluaron *in silico* el potencial biológico de algunas moléculas de *Maytenus gonoclada*, en esta evaluación se obtuvo que al menos seis de éstas pueden tener una potencial de inhibición sobre AR (De Oliveira et al., 2014). Estos estudios posicionan a

las especies del género *Maytenus* como objeto de estudio para el descubrimiento de compuesto que tengan actividad biológica para la prevención de resistencia a enzalutamida en CRPC.

Como se menciona anteriormente, AR puede ser expresado por la activación de la vía AKT, la cuál puede ser mediada por ROS (Koundouros & Pouligiannis, 2018). Nuestros resultados informan que dihidromiricetina, produce un aumento en la producción de ROS, a pesar de prevenir la activación de la vía NF- κ B, por lo que es posible que el aumento de expresión de AR por dihidromiricetina sea dado por la relación entre ROS/AKT y no ROS/NF- κ B, lo que implicaría que dihidromiricetina genera un mecanismo de inactivación de NF- κ B, ya sea de forma directa sobre las subunidades del complejo o las kinasas que provocan su fosforilación.

Olaniyan *et al*, al utilizar un modelo de rata Wistar, con ovario poliquístico inducido por dehidropiandrógeno, demuestran que al tratar las ratas con una dosis de 100 mg/kg diarios de quercetina por 15 días, los niveles de ARNm de AR disminuyen significativamente, lo cual sugiere que quercetina podría regular de forma negativa la expresión de AR en tejido de ovario (Olaniyan et al., 2020). Xing *et al*, al utilizar dosis de 10 – 100 μ M de quercetina por 48 horas, previenen la expresión de AR basal o la inducida por el andrógeno mibolerona (Mib) en células LNCaP (Xing et al., 2001). En células LNCaP resistentes a docetaxel, Lu *et al*, indican que al tratar con una dosis de 20 μ M de quercetina, se disminuye la expresión de AR, 48 horas posterior al tratamiento mediante la inactivación de la vía AKT (X. Lu et al., 2020). En células LNCaP a las cuales se les transfectó un reportero de la actividad

transcripcional de AR asociado a luciferasa, se demuestra que al tratar por 48 horas con 50 y 100 μM de quercetina, disminuyen la actividad del receptor, mediante la inhibición de la síntesis de ADN (Morris et al., 2006). Otro resultado concordante con el obtenido es el de Tummala *et al*, quienes demuestran que dosis de quercetina disminuyen la expresión de AR y AR-V7 en células C4-2B y 22Rv1 resistentes a enzalutamida a través de la regulación negativa hnRNPA1, proteína que regula positivamente la expresión de AR y AR-V7 (Tummala et al., 2017).

Así como la expresión de AR es mediado por diferentes vías de señalización, se ha demostrado que su isoforma AR-V7 es mediada por estas mismas vías, esto dado que Mediwala *et al*, demuestran que al utilizar inhibidores de la vía AKT en células PC-3 y LNCaP transfectadas con un reportero de la actividad transcripcional de AR-V7, disminuye la actividad transcripcional de este marcador (Mediwala et al., 2013). Shen *et al*, demuestran que MAPK4, aumenta la expresión de AR-V7, mediante la activación de la vía de AKT a través de la inactivación de PTEN, uno de los supresores de tumor más importantes en cáncer (Shen et al., 2021).

No es posible encontrar reportes de la actividad de dihidromiricetina sobre AR-V7, pero si hay flavonoides a los que se les reporta dicha actividad. Tal es el caso de luteína, flavonoide que en tratamientos de 25 y 50 μM reduce la expresión de AR-V7 en células VCaP (Naiki-Ito et al., 2020). Quercetina en dosis de 40 μM , previene la expresión de AR-V7 inducida por radiación en células 22Rv1 y VCaP (D. Chen et al., 2021), lo cual concuerda con los resultados obtenidos para este marcador de resistencia.

9.9. Efecto dihidromiricetina y quercetina sobre la citotoxicidad de enzalutamida en células C4-2B tratadas con oxLDL

Finalmente, para analizar si los efectos de LOX-1/oxLDL sobre la resistencia a enzalutamida pueden ser prevenidos con co-tratamientos de dihidromiricetina 50 μM y quercetina 25 μM , se analizó el efecto de estas moléculas en presencia de enzalutamida 20 μM con o sin oxLDL en células C4-2B. Los resultados demostraron que quercetina promueve un efecto sinérgico con enzalutamida, y previene además los efectos de LOX-1/oxLDL, generando incluso un aumento de los efectos citotóxicos de enzalutamida en presencia de oxLDL, lo cual es paradójico respecto a la presencia de enzalutamida y oxLDL, lo cual genera una resistencia a la citotoxicidad. Esto podría explicarse con los efectos que esta molécula tiene sobre las rutas mencionadas anteriormente, como las vías dependientes de ROS, como NF- κB , AKT, entre otras. Dihidromiricetina no presenta un efecto significativo al compararse con las células tratadas con oxLDL y enzalutamida, efecto que puede ser dado por el aumento que produce en AR y la mantención de AR-V7, mediada por esta molécula.

10. CONCLUSIONES

En esta tesis se ha planteado como hipótesis de esta tesis es que los flavonoides dihidromiricetina y quercetina previenen el desarrollo de resistencia a enzalutamida, inducida por LOX-1/oxLDL a través de la prevención de la activación de la vía NF- κ B. Esto debido al aumento de ROS que se produce al interactuar LOX-1 con oxLDL.

Para aceptar o refutar la hipótesis planteada se realizaron mediciones de ROS, fosforilación de I κ B- α , NF- κ B subunidad p65, expresión de AR, AR-V7 y el efecto de dihidromiricetina y quercetina en la citotoxicidad de enzalutamida.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, es posible aceptar parcialmente dicha hipótesis, esto debido a que demostramos que la activación de LOX-1 inducida por oxLDL genera una resistencia a enzalutamida mediada en parte por ROS, activación de la vía NF- κ B y la sobreexpresión de AR y AR-V7. Sin embargo, solo quercetina previene los efectos inducidos por LOX-1/oxLDL, tales como, la generación de ROS, fosforilación de I κ B- α , NF- κ B subunidad p65, expresión de AR, AR-V7 y aumenta la citotoxicidad de enzalutamida aún en presencia de oxLDL. En cambio, dihidromiricetina a pesar de prevenir la fosforilación de I κ B- α y la subunidad p65 de NF- κ B inducida por LOX-1/oxLDL, aumenta la generación de ROS, la expresión de marcadores de resistencia a enzalutamida y no tiene efectos en la prevención de la citotoxicidad de enzalutamida en tratamiento con oxLDL.

De esta forma, solo quercetina podría posicionarse como un potencial adyuvante para tratamientos con enzalutamida en pacientes con CRPC. Sin embargo, es necesario profundizar en estos estudios de la utilización de quercetina como adyuvante, debido a que en un contexto clínico es importante estar seguros de que no se promueva una resistencia inducida por esta molécula a otros fármacos utilizados en paralelo o posterior a la resistencia a enzalutamida, como abiraterona o los taxanos docetaxel, cabazitaxel.



11. GLOSARIO

- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- ADT** – Terapia de privación de andrógenos
- Akt** – Proteína quinasa B
- AR** – Receptor de Andrógenos
- AR-V7** – Variante 7 del Receptor de Andrógenos
- ARN** – Ácido ribonucleico
- ARNm** – ARN mensajero
- CPRC** – Cáncer de próstata resistente a castración
- DHM** – Dihidromiricetina
- EGF** – Factor de crecimiento epidemial
- IC₅₀** – Concentración inhibidora 50
- ICAM** – Molécula de adhesión intercelular
- IKK** – IκB quinasa
- IL-1β** – Interleuquina 1 beta
- IL-6** – Interleuquina 6
- IL-8** – Interleuquina 8
- LDL** – Lipoproteína de baja densidad
- LOX-1** – Receptor de LDL oxidada *Lectin-like 1*
- MAPK** – Proteína quinasa activada por mitógenos
- MD** – Extracto total de *Maytenus disticha*
- NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NF-κB** – Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activas
- oxHDL** – Lipoproteína de alta densidad oxidada
- oxLDL** – Lipoproteína de baja densidad oxidada
- PSA** – Antígeno específico prostático
- QRC** – Quercetina
- ROS** – Especies reactivas del oxígeno
- siARN** – ARN de silenciamiento

STAT3 – Transductor de señales y activador de transcripción 3

VEGF – Factor de crecimiento de epitelio vascular



12. REFERENCIAS

- Anrather, J., Racchumi, G., & Iadecola, C. (2006). NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5657–5667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506172200>
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Lubber, B., Nakazawa, M., Roeser, J., Chen, Y., Mohammad, T., Chen, Y., Fedor, H., Lotan, T. L., Zheng, Q., De Marzo, A. M., Isaacs, J. T., Isaacs, W. B., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A., ... Juo, Luo. (2015). AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *European Urology*, 68(1), 162–163. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.03.054>
- Armstrong, A. J., Szmulewitz, R. Z., Petrylak, D. P., Holzbeierlein, J., Villers, A., Azad, A., Alcaraz, A., Alekseev, B., Iguchi, T., Shore, N. D., Rosbrook, B., Sugg, J., Baron, B., Chen, L., & Stenzl, A. (2019). Arches: A randomized, phase III study of androgen deprivation therapy with enzalutamide or placebo in men with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 37(32), 2974–2986. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00799>
- Austin, D. C., Strand, D. W., Love, H. L., Franco, O. E., Jang, A., Grabowska, M. M., Miller, N. L., Hameed, O., Clark, P. E., Fowke, J. H., Matusik, R. J., Jin, R. J., & Hayward, S. W. (2016). NF- κ B and androgen receptor variant expression correlate with human BPH progression. *Prostate*, 76(5), 491–511. <https://doi.org/10.1002/pros.23140>
- Awouafack, M. D., Tane, P., & Hiroyuki, M. (2016). Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. *Intech*, i(0974–8369), 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Balzan, S., & Lubrano, V. (2018). LOX-1 receptor: A potential link in atherosclerosis and cancer. *Life Sciences*, 198, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.024>
- Barrera, E., & Meza, I. (1982). Analisis de la cuticula foliar de las especies chilenas del genero. *Boletín Del Museo Nacional de Historia Natural*, 39, 29–36.
- Beer, T. M., Armstrong, A. J., Rathkopf, D. E., Lorient, Y., Sternberg, C. N., Higano, C. S., Iversen, P., Bhattacharya, S., Carles, J., Chowdhury, S., Davis, I. D., de Bono, J. S., Evans, C. P., Fizazi, K., Joshua, A. M., Kim, C.-S., Kimura, G., Mainwaring, P., Mansbach, H., ... Tombal, B. (2014). Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *New*

England Journal of Medicine, 371(5), 424–433.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1405095>

Bhat, F. A., Sharmila, G., Balakrishnan, S., Singh, P. R., Srinivasan, N., & Arunakaran, J. (2014). Epidermal growth factor-induced prostate cancer (PC3) cell survival and proliferation is inhibited by quercetin, a plant flavonoid through apoptotic machinery. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 4(4), 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.07.003>

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, January, 9–19.

Bray, F., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2018). *Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. 394–424.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Buttigliero, C., Tucci, M., Bertaglia, V., Vignani, F., Bironzo, P., Di Maio, M., & Scagliotti, G. V. (2015). Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 41(10), 884–892. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.08.002>

Caffo, O., Maines, F., Veccia, A., Kinspergher, S., & Galligioni, E. (2016). Splice variants of androgen receptor and prostate cancer. *Oncology Reviews*, 10(297), 14–18. <https://doi.org/10.4081/oncol.2016.297>

Caiqi, M. A., Jinye, X. I. E., Chuanghua, L. U. O., Haofan, Y. I. N., Ruopu, L. I., Wang, X., Xiong, W., Zhang, T., Jiang, P., Weiwei, Q. I., Zhou, T., Yang, Z., Wang, W., Jianxing, M. A., Guoquan, G. A. O., & Yang, X. (2019). OxLDL promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in gastric cancer by upregulating VEGF-C expression and secretion. *International Journal of Oncology*, 54(2), 572–584. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4648>

Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology*, 4(3), 365–380. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02>

Chaturvedula, V., And, R. H.-J. of P., & 2013, U. (2013). Isolation and NMR Spectral Studies of Dihydromyricetin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4), 113–115.

Chekalina, N., Burmak, Y., Petrov, Y., Borisova, Z., Manusha, Y., Kazakov, Y., & Kaidashev, I. (2018). Quercetin reduces the transcriptional

activity of NF- κ B in stable coronary artery disease. *Indian Heart Journal*, 70(5), 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.04.006>

Chen, D., Chen, Y., Tian, H., Wang, Y., Niu, Y., Huang, C., You, B., Yeh, S., Xing, N., & Chang, C. (2021). Targeting the Radiation-Induced ARv7-Mediated circNHS / miR-512-5p / XRCC5 Signaling With Quercetin Signaling Increases Prostate Cancer Radiosensitivity. *Research Square*, 1–23. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-659472/v1>

Chen, T. J., Jeng, J. Y., Lin, C. W., Wu, C. Y., & Chen, Y. C. (2006). Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology*, 223(1–2), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.03.007>

Chen, T., Zhang, X., Zhu, G., Liu, H., Chen, J., Wang, Y., & He, X. (2020). Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway in vitro. *Medicine*, 99(38), e22241. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022241>

Chen, X. ping, Xun, K. li, Wu, Q., Zhang, T. tai, Shi, J. shan, & Du, G. hua. (2007). Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Role of reactive oxygen species. *Vascular Pharmacology*, 47(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2007.01.004>

Cheng, S. C., Huang, W. C., Pang, J. H. S., Wu, Y. H., & Cheng, C. Y. (2019). Quercetin inhibits the production of il-1 β -induced inflammatory cytokines and chemokines in arpe-19 cells via the mapk and nf- κ b signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122957>

Chile, I. de. (2017). *Atención Y Tratamiento Del Cáncer En Chile*. 1–17.

Chio, C., & Tuveson, D. A. (2017). Feature Review ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends in Molecular Medicine*, 23(5), 411–429. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.03.004>

Cominacini, L., Fratta Pasini, A., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, M. L., Campagnola, M., Rigoni, A., Pastorino, A. M., Lo Cascio, V., & Sawamura, T. (2000). Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF- κ B through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12633–12638. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12633>

Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., Pastorino, A. M., Lo Cascio, V., & Sawamura, T. (2001). The Binding of Oxidized Low Density Lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL

Receptor-1 Reduces the Intracellular Concentration of Nitric Oxide in Endothelial Cells through an Increased Production of Superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13750–13755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010612200>

Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G., & Klocker, H. (1995). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor and epidermal growth factor. *European Urology*, 27(SUPPL. 2), 45–47. <https://doi.org/10.1159/000475232>

Da Silva, R., Uno, M., Nagahashi Marie, S. K., & Oba-Shinjo, S. M. (2015). LOX expression and functional analysis in astrocytomas and impact of IDH1 mutation. *PLoS ONE*, 10(3), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119781>

De Oliveira, M. L. G., Assenco, R. A. G., Silva, G. D. F., Lopes, J. C. D., Silva, F. C., Lanna, M. C. S., De Magalhães, J. C., Duarte, L. P., & Vieira Filho, S. A. (2014). Cytotoxicity, Anti-poliovirus activity and in silico biological evaluation of constituents from maytenus gonoclada (ceastraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(10), 130–137.

Debes, J. D., & Tindall, D. J. (2004). Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(15), 1488–1490. <https://doi.org/10.1056/NEJMp048178>

Diagone, C. A., Colombo, R., Lanças, F. M., & Yariwake, J. H. (2012). CZE/PAD and HPLC-UV/PAD Profile of Flavonoids from Maytenus aquifolium and Maytenus ilicifolia “espinheira santa” Leaves Extracts . *Chromatography Research International*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/691509>

Durackova, Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiological Research*, 59, 459–469.

Fan, T. F., Wu, T. F., Bu, L. L., Ma, S. R., Li, Y. C., Mao, L., Sun, Z. J., & Zhang, W. F. (2016). Dihydromyricetin promotes autophagy and apoptosis through ROS-STAT3 signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(37), 59691–59703. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10836>

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, B. F. . (2020). International Agency for Research on Cancer 2020. *Global Cancer Observatory: Cancer Today.*, 419, 1–2.

Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33(12), 1061–1080. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00077-1)

Fujita, K., & Nonomura, N. (2019). Role of androgen receptor in prostate cancer. *World Journal of Men's Health*, 37(3), 288–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.5534/wjmh.180040>

García-Roman, R., Salazar-González, D., Rosas, S., Arellanes-Robledo, J., Beltrán-Ramírez, O., Fattel-Fazenda, S., & Villa-Treviño, S. (2008). The differential NF- κ B modulation by S-adenosyl-L-methionine, N-acetylcysteine and quercetin on the promotion stage of chemical hepatocarcinogenesis. *Free Radical Research*, 42(4), 331–343. <https://doi.org/10.1080/10715760802005169>

Gardi, C., Bauerova, K., Stringa, B., Kuncirova, V., Slovak, L., Ponist, S., Drafi, F., Bezakova, L., Tedesco, I., Acquaviva, A., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2015). Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 583, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.008>

GLOBOCAN. (2019). *Cancer Chile*.

González-Chavarría, I., Duprat, F., Roa, F. J., Jara, N., Toledo, J. R., Miranda, F., Becerra, J., Inostroza, A., Kelling, A., Schilde, U., Heydenreich, M., & Paz, C. (2020). Maytenus disticha Extract and an Isolated β -Dihydroagarofuran Induce Mitochondrial Depolarization and Apoptosis in Human Cancer Cells by Increasing Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Biomolecules*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/biom10030377>

González-Chavarría, I., Fernandez, E., Gutierrez, N., González-Horta, E. E., Sandoval, F., Cifuentes, P., Castillo, C., Cerro, R., Sanchez, O., & Toledo, J. R. (2018). LOX-1 activation by oxLDL triggers an epithelial mesenchymal transition and promotes tumorigenic potential in prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 414, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.035>

Granado-serrano, A. B., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L., Bel, A., Mart, A., Bravo, L., & Goya, L. (2010). Quercetin Modulates NF- κ B and AP-1/JNK Pathways to Induce Cell Death in Human Hepatoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 62(3), 390–401. <https://doi.org/10.1080/01635580903441196>

Grönberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *Lancet*, 361(9360), 859–864. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12713-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12713-4)

- Guo, L., Zhang, H., & Yan, X. (2019). Protective effect of dihydromyricetin reverts fatty liver through nuclear factor- κ B/p53/B-cell lymphoma 2-associated X protein signaling pathways in a rat model. *Molecular Medicine Reports*, 19(3), 1638–1644. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9783>
- Ha, S., Ruoff, R., Kahoud, N., Franke, T. F., & Logan, S. K. (2011). Androgen receptor levels are upregulated by Akt in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 18(2), 245–255. <https://doi.org/10.1530/ERC-10-0204>
- Han, H., Dong, Y., & Ma, X. (2020). Dihydromyricetin Protects Against Gentamicin-Induced Ototoxicity via PGC-1 α /SIRT3 Signaling in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00702>
- Han, J. M., Kim, H. L., & Jung, H. J. (2021). Ampelopsin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hl60 and k562 leukemia cells by downregulating akt and nf- κ b signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084265>
- Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Joshi, A., Zhang, Y., Jaeger, S. A., Bulyk, M., Tschlis, P. N., Shirley Liu, X., & Struhl, K. (2010). A Transcriptional Signature and Common Gene Networks Link Cancer with Lipid Metabolism and Diverse Human Diseases. *Cancer Cell*, 17(4), 348–361. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.022>
- Hou, X. L., Tong, Q., Wang, W. Q., Shi, C. Y., Xiong, W., Chen, J., Liu, X., & Fang, J. G. (2015). Suppression of Inflammatory Responses by Dihydromyricetin, a Flavonoid from Ampelopsis grossedentata, via Inhibiting the Activation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Journal of Natural Products*, 78(7), 1689–1696. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00275>
- Huang, B., Li, Y., Yao, Y., Shu, W., & Chen, M. (2018). Dihydromyricetin from ampelopsis grossedentata protects against vascular neointimal formation via induction of TR3. *European Journal of Pharmacology*, 838, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.09.002>
- Huang, Y., Jiang, X., Liang, X., & Jiang, G. (2018). Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncology Letters*, 15(5), 6063–6076. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8123>
- Hussain, M., Fizazi, K., Saad, F., Rathenborg, P., Shore, N., Ferreira, U., Ivashchenko, P., Demirhan, E., Modelska, K., Phung, D., Krivoshik, A., & Sternberg, C. N. (2018). Enzalutamide in Men with Nonmetastatic,

Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 378(26), 2465–2474. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1800536>

Jin, R., Yamashita, H., Yu, X., Wang, J., Franco, O. E., Wang, Y., Hayward, S. W., & Matusik, R. J. (2015). Inhibition of NF-kappa B signaling restores responsiveness of castrate-resistant prostate cancer cells to anti-androgen treatment by decreasing androgen receptor-variant expression. *Oncogene*, 34(28), 3700–3710. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.302>

Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(7), 378–398. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-009654-4.50037-6>

Khaidakov, M., & Mehta, J. L. (2012). Oxidized LDL Triggers Pro-Oncogenic Signaling in Human Breast Mammary Epithelial Cells Partly via Stimulation of MiR-21. *PLoS ONE*, 7(10), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046973>

Khaidakov, M., Mitra, S., Kang, B. Y., Wang, X., Kadlubar, S., Novelli, G., Raj, V., Winters, M., Carter, W. C., & Mehta, J. L. (2011). Oxidized LDL receptor 1 (OLR1) as a possible link between obesity, dyslipidemia and cancer. *PLoS ONE*, 6(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020277>

Khurana, N., Kim, H., Chandra, P. K., Talwar, S., Sharma, P., Abdel-Mageed, A. B., Sikka, S. C., & Mondal, D. (2017). Multimodal actions of the phytochemical sulforaphane suppress both AR and AR-V7 in 22Rv1 cells: Advocating a potent pharmaceutical combination against castration-resistant prostate cancer. *Oncology Reports*, 38(5), 2774–2786. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5932>

Khurana, N., Talwar, S., Chandra, P. K., Sharma, P., Abdel-Mageed, A. B., Mondal, D., & Sikka, S. C. (2016). Sulforaphane increases the efficacy of anti-androgens by rapidly decreasing androgen receptor levels in prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 49(4), 1609–1619. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3641>

Kiliccioglu, I., Konac, E., Dikmen, A. U., Sozen, S., & Bilen, C. Y. (2019). Hsp-27 and NF-κB pathway is associated with AR/AR-V7 expression in prostate cancer cells. *Gene*, 697(December 2018), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.055>

Kono, M., Fujii, T., Lim, B., Sri Karuturi, M., Tripathy, D., & Ueno, N. T. (2017). Androgen receptor function and androgen receptor-targeted

therapies in breast cancer: A review. *JAMA Oncology*, 3(9), 1266–1273. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4975>

Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2018). Phosphoinositide 3-Kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer. *Frontiers in Oncology*, 8(MAY), 2–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00160>

Lallemand, J. Y., & Duteil, M. (1977). ¹³C n.m.r. spectra of quercetin and rutin. *Organic Magnetic Resonance*, 9(3), 179–180. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270090317>

Leite, J. P. V., Rastrelli, L., Romussi, G., Oliveira, A. B., Vilegas, J. H. Y., Vilegas, W., & Pizza, C. (2001). Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3796–3801. <https://doi.org/10.1021/jf010294n>

Li, C., Zhang, J., Wu, H., Li, L., Yang, C., Song, S., Peng, P., Shao, M., Zhang, M., Zhao, J., Zhao, R., Wu, W., Ruan, Y., Wang, L., & Gu, J. (2017). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 facilitates metastasis of gastric cancer through driving epithelial-mesenchymal transition and PI3K/Akt/GSK3 β activation. *Scientific Reports*, 7(September 2016), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep45275>

Li, C.-H., Ding, H., Shi, J.-L., Huang, B., Ding, H., Lin, H.-G., Zeng, J.-C., Zhao, Y., & Luo, G.-Q. (2021). Dihydromyricetin promotes apoptosis, suppresses proliferation and tumor necrosis factor- α -mediated nuclear factor kappa-B activation in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cell. *Journal of Traditional Chinese Medicine = Chung i Tsa Chih Ying Wen Pan*, 41(3), 367–375. <https://doi.org/10.19852/j.cnki.jtcm.2021.03.004>

Liu, D., Mao, Y., Ding, L., & Zeng, X. A. (2019). Dihydromyricetin: A review on identification and quantification methods, biological activities, chemical stability, metabolism and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 91(March), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.038>

Liu, T. T., Zeng, Y., Tang, K., Chen, X. M., Zhang, W., & Xu, X. Le. (2017). Dihydromyricetin ameliorates atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Atherosclerosis*, 262, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.003>

Liu, V. W. S., Yau, W. L., Tam, C. W., Yao, K. M., & Shiu, S. Y. W. (2017). Melatonin inhibits androgen receptor splice variant-7 (AR-V7)-induced nuclear factor-Kappa B (NF-KB) activation and NF-KB activator-induced AR-V7 expression in prostate cancer cells: Potential implications for the

use of melatonin in castration-resistant . *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18061130>

Liu, X., Zhao, J., Xu, J. P., Zhao, B. X., Zhang, Y., Zhang, S. L., & Miao, J. Y. (2009). Protective effects of a benzoxazine derivative against oxidized LDL-induced apoptosis and the increases of integrin β 4, ROS, NF- κ B and P53 in human umbilical vein endothelial cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(10), 2896–2900. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.070>

Lu, J., Mitra, S., Wang, X., Khaidakov, M., & Mehta, J. L. (2011). Oxidative Stress and Lectin-Like Ox-LDL-Receptor LOX-1 in Atherogenesis and Tumorigenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(8), 2301–2333. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3792>

Lu, X., Yang, F., Chen, D., Zhao, Q., Chen, D., Ping, H., & Xing, N. (2020). Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/AKT signaling pathways. *International Journal of Biological Sciences*, 16(7), 1121–1134. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41686>

Lubrano, V., & Balzan, S. (2014). LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage. In *Free Radical Research* (Vol. 48, Issue 8, pp. 841–848). <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.929122>

Luo, J., Attard, G., Balk, S. P., Bevan, C., Burnstein, K., Cato, L., Cherkasov, A., De Bono, J. S., Dong, Y., Gao, A. C., Gleave, M., Heemers, H., Kanayama, M., Kittler, R., Lang, J. M., Lee, R. J., Logothetis, C. J., Matusik, R., Plymate, S., ... Raj, G. V. (2018). Role of Androgen Receptor Variants in Prostate Cancer: Report from the 2017 Mission Androgen Receptor Variants Meeting. *European Urology*, 73(5), 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.11.038>

Luo, Y., Lu, S., Dong, X., Xu, L., Sun, G., & Sun, X. (2017). Dihydromyricetin protects human umbilical vein endothelial cells from injury through ERK and Akt mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Apoptosis*, 22(8), 1013–1024. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1381-3>

Marcia Avello, L., & Isabel Cisternas, F. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile*, 138(10), 1288–1293.

Mediwala, S. N., Sun, H., Szafran, A. T., Hartig, S. M., Sonpavde, G., Hayes, T. G., Thiagarajan, P., Mancini, M. A., & Marcelli, M. (2013). The activity of the androgen receptor variant AR-V7 is regulated by FOXO1 in a PTEN-PI3K-AKT-dependent way. *Prostate*, 73(3), 267–277. <https://doi.org/10.1002/pros.22566>

Meng, L. Q., Yang, F. Y., Wang, M. S., Shi, B. K., Chen, D. X., Chen, D., Zhou, Q., He, Q. B., Ma, L. X., Cheng, W. L., & Xing, N. Z. (2018). Quercetin protects against chronic prostatitis in rat model through NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Prostate*, 78(11), 790–800. <https://doi.org/10.1002/pros.23536>

Metlen, K. L., Aschehoug, E. T., & Callaway, R. M. (2009). Plant behavioural ecology: Dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant, Cell and Environment*, 32(6), 641–653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01910.x>

Ministerio de Salud de Chile. (2018). *Plan Nacional de Cáncer 2018 - 2028*.

Minsal. (2015). *Guía Clínica AUGÉ CÁNCER DE PRÓSTATA en personas de 15 años y más*.

Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>

Miyamoto, D. T., Lee, R. J., Stott, S. L., Ting, D. T., Wittner, B. S., Ulman, M., Smas, M. E., Lord, J. B., Brannigan, B. W., Trautwein, J., Bander, N. H., Wu, C. L., Sequist, L. V., Smith, M. R., Ramaswamy, S., Toner, M., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2012). Androgen receptor signaling in circulating tumor cells as a marker of hormonally responsive prostate cancer. *Cancer Discovery*, 2(11), 995–1003. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0222>

Molares, S., & Ladio, A. (2009). Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora: Use patterns on a regional scale. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.003>

Montenegro G, Gómez M, Iturriaga L, T. B. (1994). Potencialidad de la flora nativa chilena como fuente de productos naturales de uso medicinal. *Rojasiana*, 2(2), 49–66.

Moreira, R. B., Debiassi, M., Francini, E., Nuzzo, P. V, Choueiri, T. K., & Schutz, F. A. (2016). Differential side effects profile in mCRPC patients treated with abiraterone or enzalutamide: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 14(4), 14–15. https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.2_suppl.73

Morel, K. L., Hamid, A. A., Clohessy, J. G., Pandell, N., Ellis, L., & Sweeney, C. J. (2021). NF- κ B Blockade with Oral Administration of Dimethylaminoparthenolide (DMAPT), Delays Prostate Cancer Resistance to Androgen Receptor (AR) Inhibition and Inhibits AR

Variants. *Molecular Cancer Research*, 19(7), 1137 LP – 1145. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0099>

Morris, J. D. H., Pramanik, R., Zhang, X., Carey, A. M., Ragavan, N., Martin, F. L., & Muir, G. H. (2006). Selenium- or quercetin-induced retardation of DNA synthesis in primary prostate cells occurs in the presence of a concomitant reduction in androgen-receptor activity. *Cancer Letters*, 239(1), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.037>

Murdocca, M., Mango, R., Pucci, S., Biocca, S., Testa, B., Capuano, R., Paolesse, R., Sanchez, M., Orlandi, A., di Natale, C., Novelli, G., & Sangiuolo, F. (2016). The lectin-like oxidized LDL receptor-1: a new potential molecular target in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(12). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7430>

Nadiminty, N., Tummala, R., Liu, C., Yang, J., Lou, W., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2013). NF- κ B/p52 induces resistance to enzalutamide in prostate cancer: Role of androgen receptor and its variants. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(8), 1629–1637. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0027>

Nagelreiter, I. M., Parvardeh, M., Narzt, M. S., Beer, L., Kremslehner, C., Muresan, X. M., Grillari, J., Zouboulis, C. C., Tschachler, E., & Gruber, F. (2018). OLR1 scavenger receptor knockdown affects mitotic gene expression but is dispensable for oxidized phospholipid-mediated stress signaling in SZ 95 sebocytes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 172(November), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.11.002>

Naiki-Ito, A., Naiki, T., Kato, H., Iida, K., Etani, T., Nagayasu, Y., Suzuki, S., Yamashita, Y., Inaguma, S., Onishi, M., Tanaka, Y., Yasui, T., & Takahashi, S. (2020). Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis*, 41(8), 1148–1157. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz193>

Nelson, A. W., & Shah, N. (2019). Prostate cancer. *Surgery (United Kingdom)*, 37(9), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.07.006>

Nieto, S., Garrido, A., Sanhueza, J., Loyola, L. A., Morales, G., Leighton, F., & Valenzuela, A. (1993). Flavonoids as stabilizers of fish oil: An alternative to synthetic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(8), 773–778. <https://doi.org/10.1007/BF02542599>

Olaniyan, O. T., Bamidele, O., Adetunji, C. O., Priscilla, B., Femi, A., Ayobami, D., Okotie, G., Oluwaseun, I., Olugbenga, E., & Mali, P. C. (2020). Quercetin modulates granulosa cell mRNA androgen receptor gene expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in

Wistar rats via metabolic and hormonal pathways. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 31(4), 1–18. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0076>

Organización Panamericana de la Salud, & Organización Mundial de la Salud. (2019). *Plan de acción para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles en las Américas 2013-2019*.

Pande, D., Negi, R., Karki, K., Khanna, S., Dwivedi, U. S., Khanna, R. S., & Khanna, H. D. (2015). Oxidative Stress, Antioxidant Status, and Redox Signaling in Carcinogenesis. *Free Radicals in Human Health and Disease*, 351–368. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0>

Pérez, L., Vallejos, A., Echeverría, C., Varela, D., Cabello-Verrugio, C., & Simon, F. (2019). OxHDL controls LOX-1 expression and plasma membrane localization through a mechanism dependent on NOX/ROS/NF- κ B pathway on endothelial cells. *Laboratory Investigation*, 99(3), 421–437. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0151-3>

Pirillo, A., Norata, G. D., & Catapano, A. L. (2013). LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis. 2013, 12.

Quinn, M. T., Ammons, M. C. B., & Leo, F. R. D. E. (2006). The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clinical Science*, 20, 1–20. <https://doi.org/10.1042/CS20060059>

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiorvascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>

Raniolo, S., Vindigni, G., & Biocca, S. (2016). Cholesterol level regulates lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 function. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 5(s1), S87–S99. <https://doi.org/10.3233/bsi-160156>

Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, Helen. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(12), 2821–2831. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.004>

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

Rezaei-Sadabady, R., Eidi, A., Zarghami, N., & Barzegar, A. (2016). Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of quercetin and quercetin-encapsulated liposomes. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(1), 128–134. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.926456>

Rios, Alvaro, Alanis, Glafiro, Favela, S. (2017). Etnobotánica de los recursos vegetales, sus formas de uso y manejo, en Bustamante, Nuevo León. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(44).

Schalken, J., & Fitzpatrick, J. M. (2016). Enzalutamide: Targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU International*, 117(2), 215–225. <https://doi.org/10.1111/bju.13123>

Schmeisser, A., Soehnlein, O., Illmer, T., Lorenz, H. M., Eskafi, S., Roerick, O., Gabler, C., Strasser, R., Daniel, W. G., & Garlich, C. D. (2004). ACE inhibition lowers angiotensin II-induced chemokine expression by reduction of NF- κ B activity and AT1 receptor expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(2), 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.059>

Senthilkumar, K., Arunkumar, R., Elumalai, P., Sharmila, G., Gunadharini, D. N., Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Benson, C. S., & Arunakaran, J. (2011). Quercetin inhibits invasion, migration and signalling molecules involved in cell survival and proliferation of prostate cancer cell line (PC-3). *Cell Biochemistry and Function*, 29(2), 87–95. <https://doi.org/10.1002/cbf.1725>

Shabbir, M., Syed, D. N., Lall, R. K., Khan, M. R., & Mukhtar, H. (2015). Potent anti-proliferative, pro-apoptotic activity of the *Maytenus Royleanus* extract against prostate cancer cells: Evidence in in-vitro and in-vivo models. *PLoS ONE*, 10(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119859>

Shang, H. S., Lu, H. F., Lee, C. H., Chiang, H. S., Chu, Y. L., Chen, A., Lin, Y. F., & Chung, J. G. (2018). Quercetin induced cell apoptosis and altered gene expression in AGS human gastric cancer cells. *Environmental Toxicology*, 33(11), 1168–1181. <https://doi.org/10.1002/tox.22623>

Shen, T., Wang, W., Zhou, W., Coleman, I., Cai, Q., Dong, B., Ittmann, M. M., Creighton, C. J., Bian, Y., Meng, Y., Rowley, D. R., Nelson, P. S., Moore, D. D., & Yang, F. (2021). MAPK4 promotes prostate cancer by concerted activation of androgen receptor and AKT. *Journal of Clinical Investigation*, 131(4). <https://doi.org/10.1172/JCI135465>

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>

Sun, J., Liu, P., Mao, J., Han, W., Jiang, X., & Gu, Y. (2020). TRIM52 positively mediates NF- κ B to promote the growth of human benign prostatic hyperplasia cells through affecting TRAF2 ubiquitination. *Life Sciences*, 259(August), 118380. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118380>

Sun, Z., Lu, W., Lin, N., Lin, H., Zhang, J., Ni, T., Meng, L., Zhang, C., & Guo, H. (2020). Dihydromyricetin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting NLRP3 inflammasome through activation of SIRT1. *Biochemical Pharmacology*, 175(568), 113888. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113888>

Tagawa, S. T., Antonarakis, E. S., Gjyrezi, A., Galletti, G., Kim, S., Worroll, D., Stewart, J., Zaher, A., Szatrowski, T. P., Ballman, K. V., Kita, K., Tasaki, S., Bai, Y., Portella, L., Kirby, B. J., Saad, F., Eisenberger, M. A., Nanus, D. M., & Giannakakou, P. (2019). Expression of AR-V7 and ARV 567Es in circulating tumor cells correlates with outcomes to taxane therapy in men with metastatic prostate cancer treated in taxynergy. *Clinical Cancer Research*, 25(6), 1880–1888. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0320>

Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G. C., Mahabeleshwar, G. H., Singh, S., & Aggarwal, B. B. (2003). Hydrogen peroxide activates NF- κ B through tyrosine phosphorylation of I κ B α and serine phosphorylation of p65. Evidence for the involvement of I κ B α kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 24233–24241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212389200>

Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L., & Xiong, L. (2019). Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7039802>

Tang, N., Ma, J., Wang, K. S., Mi, C., Lv, Y., Piao, L. X., Xu, G. H., Li, X., Lee, J. J., & Jin, X. (2016). Dihydromyricetin suppresses TNF- α -induced NF- κ B activation and target gene expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 422(1–2), 11–20. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2799-6>

Taye, A., & El-Sheikh, A. A. K. (2013). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 pathways. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(7), 740–745. <https://doi.org/10.1111/eci.12092>

Tian, X., He, Y., & Zhou, J. (2015). Progress in antiandrogen design targeting hormone binding pocket to circumvent mutation based resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00057>

Tummala, R., Lou, W., Gao, A. C., & Nadiminty, N. (2017). Quercetin targets hnRNPA1 to overcome enzalutamide resistance in prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(12), 2770–2779. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0030>

Vacaresse, N., Vieira, O., Robbesyn, F., Jürgens, G., Salvayre, R., & Negre-Salvayre, A. (2001). Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation. *British Journal of Pharmacology*, 132(8), 1777–1788. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703981>

Veloso, C. C., Soares, G. L., Perez, A. C., Rodrigues, V. G., & Silva, F. C. (2017). Pharmacological potential of maytenus species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.006>

Vilegas, W., Sanommiya, M., Rastrelli, L., & Pizza, C. (1999). Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of Maytenus aquifolium leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 403–406. <https://doi.org/10.1021/jf980114i>

Wan, F., Qin, X., Zhang, G., Lu, X., Zhu, Y., Zhang, H., Dai, B., Shi, G., & Ye, D. (2015). Oxidized low-density lipoprotein is associated with advanced-stage prostate cancer. *Tumor Biology*, 36(5), 3573–3582. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2994-6>

Wang, F., Zong, X., Du, J., Wang, W., Yuan, D., & Chen, X. (2019). Effects of dihydromyricetin on the migration and invasion of human gastric cancer MKN45 cells and its mechanism. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 35(5), 428–432. <https://doi.org/10.12047/j.cjap.5809.2019.093>

Ward, A. B., Mir, H., Kapur, N., Gales, D. N., Carriere, P. P., & Singh, S. (2018). Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways. *World Journal of Surgical Oncology*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1400-z>

Weng, L., Zhang, H., Li, X., Zhan, H., Chen, F., Han, L., Xu, Y., & Cao, X. (2017). Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling

pathways in microglia. *International Immunopharmacology*, 44, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.018>

Wu, Q., Needs, P. W., Lu, Y., Kroon, P. A., Ren, D., & Yang, X. (2018). Different antitumor effects of quercetin, quercetin-3'-sulfate and quercetin-3-glucuronide in human breast cancer MCF-7 cells. *Food and Function*, 9(3), 1736–1746. <https://doi.org/10.1039/c7fo01964e>

Wu, T. C., Chan, S. T., Chang, C. N., Yu, P. S., Chuang, C. H., & Yeh, S. L. (2018). Quercetin and chrysin inhibit nickel-induced invasion and migration by downregulation of TLR4/NF- κ B signaling in A549 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 292(110), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.010>

Xing, N., Chen, Y., Mitchell, S. H., & Young, C. Y. F. (2001). Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells inhibited by quercetin in a dose-dependent manner. *Carcinogenesis*, 22(3), 409–414.

Xu, S., Ogura, S., Chen, J., Little, P. J., Moss, J., & Liu, P. (2013). LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(16), 2859–2872. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1194-z>.LOX-1

Zhang, H., Zhang, M., Yu, L., Zhao, Y., He, N., & Yang, X. (2012). Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1589–1599. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.025>

Zhang, J., Yin, J., Zhao, D., Wang, C., Zhang, Y., Wang, Y., & Li, T. (2019). Therapeutic effect and mechanism of action of quercetin in a rat model of osteoarthritis. *Journal of International Medical Research*, 48(3). <https://doi.org/10.1177/0300060519873461>

Zhang, L., Altuwaijri, S., Deng, F., Chen, L., Lal, P., Bhanot, U. K., Korets, R., Wenske, S., Lilja, H. G., Chang, C., Scher, H. I., & Gerald, W. L. (2009). NF- κ B regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *American Journal of Pathology*, 175(2), 489–499. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080727>

Zhang, X. A., Zhang, S., Yin, Q., & Zhang, J. (2015). Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. *Pharmacognosy Magazine*, 11(42), 404–409. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.153096>

Zhang, X., Huang, J., Yu, C., Xiang, L., Li, L., Shi, D., & Lin, F. (2020). Quercetin enhanced paclitaxel therapeutic effects towards PC-3 prostate

cancer through ER stress induction and ros production. *OncoTargets and Therapy*, 13, 513–523. <https://doi.org/10.2147/OTT.S228453>

Zhang, X., Li, X., Fang, J., Hou, X., Fang, H., Guo, F., Li, F., Chen, A., & Huang, S. (2018). (2R,3R)Dihydromyricetin inhibits osteoclastogenesis and bone loss through scavenging LPS-induced oxidative stress and NF- κ B and MAPKs pathways activating. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(11), 8981–8995. <https://doi.org/10.1002/jcb.27154>

Zhou, D. Z., Sun, H. Y., Yue, J. Q., Peng, Y., Chen, Y. M., & Zhong, Z. J. (2017). Dihydromyricetin induces apoptosis and cytoprotective autophagy through ROS-NF- κ B signalling in human melanoma cells. *Free Radical Research*, 51(5), 517–528. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1328552>

Zhu, X. H., Lang, H. D., Wang, X. L., Hui, S. C., Zhou, M., Kang, C., Yi, L., Mi, M. T., & Zhang, Y. (2019). Synergy between dihydromyricetin intervention and irinotecan chemotherapy delays the progression of colon cancer in mouse models. *Food and Function*, 10(4), 2040–2049. <https://doi.org/10.1039/c8fo01756e>

Zhu, Y., Dalrymple, S. L., Coleman, I., Zheng, S. L., Xu, J., Jody, E., Antonarakis, E. S., Marzo, A. M. De, Meeker, A. K., Nelson, S., Isaacs, W. B., Denmeade, S. R., Luo, J., Nathaniel, W., & Isaacs, J. T. (2021). Role of androgen receptor splice variant 7 (AR-V7) in prostate cancer resistance to 2nd generation androgen receptor signaling inhibitors. *Oncogene*, 39(45), 6935–6949. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01479-6>.Role