



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

FUNCIÓN DEL TNF- α Y DEL RECEPTOR DE LDL OXIDADA LOX-1 EN LA PROGRESIÓN TUMORAL DE CÁNCER COLORRECTAL

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

EDDY ERNESTO GONZÁLEZ HORTA

CONCEPCIÓN – CHILE

2020

Profesor Guía: Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso.
Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

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

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

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

Dra. Roxana Pincheira
Facultad de Ciencias Biológicas



Dr. Marcelo González
Facultad de Medicina

Dra. Marcela Hermosa
Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dr. Luis Aguayo
Director Sustituto
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

Agradecimientos

A mi tutor Dr. Jorge Toledo Alonso por su apoyo y guía en la realización de este trabajo.

A la Dra. María T. Abreu por aceptarme en su laboratorio para realizar una pasantía y al Dr. Joan Burgueño por guiar el desarrollo de esta.

A las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo de esta tesis:

- CONICYT: Beca doctorado nacional N° 63140025.
- Proyectos Fondecyt N° 1121159 y 1201217 (Dr. Jorge Toledo).
- Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción.

A los equipos de investigación donde se realizó este trabajo:

- Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- Laboratorio de Microbiología e Inmunología, Centro de Enfermedad de Crohn y Colitis, Facultad de Medicina Miller de la Universidad de Miami, Miami, Florida.

Agradezco la colaboración de todos mis compañeros, profesores y amigos de laboratorio LBB. Agradecer especialmente a mi compañera de trabajo Yosselyn Vargas por toda la ayuda que recibí de su parte en el desarrollo de esta tesis.

Especialmente a mi familia, de la cual me siento afortunado, mi madre, mi padre, mi hermana y mi sobrino que siempre han sido un apoyo fundamental en mi vida.

Finalmente, a Ramiro Suárez Mayor por todo el apoyo y comprensión brindado.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XVII
ABREVIATURAS.....	XVIII
RESUMEN	XIX
SUMMARY	XX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1- Lipoproteína de baja densidad. Estructura, modificaciones oxidativas y receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada	1
1.1.1- Lipoproteína de baja densidad, estructura y función.....	1
1.1.2- Modificaciones oxidativas de la lipoproteína de baja densidad.....	3
1.2- Identificación, regulación y funciones fisiológicas del receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada.....	4
1.2.1- LOX-1 y cáncer	12
1.3- Cáncer colorrectal	15
1.4- Obesidad, inflamación y cáncer colorrectal	18
2. HIPÓTESIS	27

3. OBJETIVOS	28
3.1- Objetivo general	28
3.2- Objetivos específicos.....	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1- Materiales.....	29
4.2- Reactivos químicos	29
4.3- Líneas celulares y bacterias	29
4.3.1- Células COLO320.....	29
4.3.2- Células HCT116.....	30
4.3.3- Células HEK293FT	30
4.3.4- Células HEK293-LOX	30
4.3.5- Células L-WRN y formulación de medio WRN completo	30
4.3.6- Células HEK293-R-espondina 2	32
4.3.7- Células HEK293/nogina y formulación de medio RENC	32
4.3.8- Top10F'	33
4.4- Plasmidios	33
4.5- Anticuerpos.....	35
4.6- Criptas colónicas humanas.....	36
4.7- Cultivo y pasaje de organoides de colon	37

4.8- Obtención y oxidación de lipoproteínas de baja densidad.....	37
4.9- Análisis de la oxidación de la LDL: movilidad electroforética y concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico	38
4.9.1- Movilidad electroforética relativa de LDL oxidada	38
4.9.2- Ensayo de formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico	39
4.10- Transformación de células quimiocompetentes.....	39
4.11- Crecimiento de cultivos bacterianos	40
4.12- Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (miniprep)	40
4.13- Purificación de ADN plasmídico a escala masiva.....	41
4.14- Digestiones de ADN plasmídico con endonucleasas de restricción ...	42
4.15- Desfosforilación de extremo 5' del vector pLKO.1 digerido con las enzimas <i>AgeI/EcoRI</i>	43
4.16- Ensamblaje de secuencia codificante para shOLR1	43
4.17- Fosforilación de extremos 5' del fragmento de ADN shOLR1	44
4.18- Reacción de ligamiento	45
4.19- Electroporación del producto de la reacción de ligamiento y obtención de colonias recombinantes.....	45
4.20- Obtención de vectores lentivirales.....	46
4.21- Determinación de dosis de puromicina mediante curvas de letalidad	46

4.22- Transducción de células de CCR con vectores lentivirales. Obtención de clones con expresión disminuida del receptor LOX-1	47
4.23- Extracción y cuantificación de proteínas totales	48
4.24- Electroforesis de geles de poliacrilamida y Western blot.....	48
4.25- Inmunofluorescencia	49
4.26- Purificación de ARN total.....	50
4.27- Análisis de expresión relativa de ARNm mediante qRT-PCR	51
4.28- Análisis de expresión del receptor LOX-1 en cáncer de colorrectal utilizando la base de datos Oncomine.....	51
4.29- Análisis de los niveles de expresión del receptor LOX-1.....	53
4.30- Tratamientos con TNF y LDL oxidada	53
4.31- Ensayos de proliferación celular.....	53
4.31.1- Conteo de células por exclusión con azul de tripán	53
4.31.2- Ensayo de reducción de bromuro de metil-thiazolil-difenil- tetrazolio.	54
4.32- Ensayos de migración celular.....	54
4.33- Ensayos de invasión celular	55
4.34- Ensayos de zimografía para analizar la actividad proteolítica de metaloproteinasas de matriz extracelular	56

4.35- Análisis del efecto de la LDL oxidada en el crecimiento de organoides de colon humanos	57
4.35.1- Análisis del efecto de la inhibición de especies reactivas del oxígeno en el crecimiento de organoides de colon humanos estimulados con LDL oxidada	57
4.36- Análisis estadístico de datos	58
5. RESULTADOS	59
5.1- Análisis de la expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares y en muestras clínicas de cáncer colorrectal	59
5.1.1- Expresión de ARNm de LOX-1 en muestras clínicas de carcinoma y adenocarcinoma colorrectal.....	59
5.1.2- Expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares de cáncer colorrectal	61
5.2- Obtención de vectores lentivirales codificantes para un shARN específico para el gen <i>OLR1</i>	63
5.2.1- Clonamiento de secuencia codificante para un shARN contra el receptor LOX-1 en el vector de transferencia lentiviral pLKO.1	63
5.2.2- Análisis funcional del vector pLKO-shOLR1	64

5.2.3- Obtención de líneas celulares de cáncer colorrectal con expresión disminuida del receptor LOX-1 mediante transducción con vectores lentivirales.....	67
5.3- Obtención y oxidación de LDL.....	68
5.4- Análisis del efecto de la LDL oxidada en la viabilidad de las células HCT116 y COLO320	70
5.5- Análisis del efecto de la lipoproteína de baja densidad oxidada en los niveles de expresión del receptor LOX-1	70
5.6- La LDL oxidada no estimula la expresión de LOX-1 en las células HCT116 y COLO320 con expresión reducida de este receptor.....	72
5.7- Análisis del efecto del factor de necrosis tumoral en la viabilidad de las células HCT116 y COLO320 y los niveles de expresión del receptor LOX-1	72
5.8- El factor de necrosis tumoral alfa y la LDL oxidada no muestran un efecto sinérgico en la expresión del receptor LOX-1.....	76
5.9- La LDL oxidada estimula la proliferación de las células humanas de cáncer colorrectal COLO320 y HCT116.....	78
5.10- El factor de necrosis tumoral alfa y la LDL oxidada no tienen efecto sinérgico en la proliferación de las células COLO320 y HCT116	82
5.11- La LDL oxidada modula la expresión de marcadores involucrados en transición epitelio-mesenquimal en células humanas de CCR.....	82

5.12- Las variaciones inducidas por la LDL oxidada sobre la expresión de marcadores involucrados en transición epitelio-mesenquimal en las células HCT116 y COLO320 son mediadas por el receptor LOX-1	89
5.13- La LDL oxidada modula la expresión de genes involucrados en migración, invasión y angiogénesis en células humanas de CCR	92
5.14- Las variaciones inducidas por la LDL oxidada sobre la expresión de genes involucrados en migración, invasión y angiogénesis en las células HCT116 y COLO320 son mediadas por el receptor LOX-1	97
5.15- La LDL oxidada estimula la migración de las células HCT116 y COLO320	97
5.16- La LDL oxidada estimula la invasión de las células COLO320	99
5.17- La LDL oxidada estimula el crecimiento de organoides humanos de mucosa colónica normal.....	101
5.17.1- El crecimiento de organoides humanos inducidos por LDL oxidada es mediado parcialmente por la generación de especies reactivas del oxígeno.....	103
6. DISCUSIÓN	105
6.1- Expresión del receptor LOX-1 en cáncer colorrectal	107
6.2- La LDL oxidada estimula la proliferación de células de cáncer colorrectal	111

6.3- La LDLox induce la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal y pro-angiogénicos en células humanas de cáncer colorrectal.	113
6.4- La LDLox induce la migración e invasión de células humanas de cáncer colorrectal.....	119
6.5- La LDL oxidada estimula la proliferación de organoides de tejido de colon sano	120
6.6- Modelo propuesto de acción del receptor LOX-1 en la progresión de cáncer colorrectal.....	122
7. CONCLUSIONES.....	125
8. BIBLIOGRAFÍA	126
9. ANEXOS	146
9.1- Anexo 1: Listado de reactivos.....	146
9.2- Anexo 2. Mapa de plasmidios para generación de vectores lentivirales	147
9.2.1- pLP1	147
9.2.2- pLP2	148
9.2.3- pLP-VSVG	149
9.2.4- pLKO.1.....	150
9.2.5- E: pEGFP-C2.....	151

9.3- Anexo 3: Curvas de letalidad de puromicina en células HCT116 (A) y COLO320 (B)	152
9.4- Anexo 4. Comparación de la morfología de las células HCT116 y HCT116/LOX(-) (A) y sus velocidades de crecimiento (B)	153
9.5- Anexo 5: Determinación de área de organoides.....	155
9.6- Anexo 6: Imágenes de organoides estimulados con concentraciones crecientes de LDLox.....	156
9.7- Anexo 7: Imágenes de organoides estimulados con 80 µg/mL de LDLox e inhibidores de la formación de ROS.....	157



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del receptor LOX-1 y unión de LDL oxidada.....	5
Figura 2: Estímulos inductores de la expresión del receptor LOX-1 y el efecto de su activación en distintos tipos celulares.	8
Figura 3: Vías de señalización activadas por LDLox/LOX-1.....	9
Figura 4: Proceso tumorigénico del cáncer colorrectal esporádico y el cáncer colorrectal asociado a colitis.	22
Figura 5: Condiciones de RT-PCR en tiempo real.....	52
Figura 6: Expresión del receptor LOX-1 en muestras clínicas de cáncer colorrectal.	61
Figura 7: Expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares de cáncer colorrectal.	62
Figura 8: Secuencia nucleotídica y representación esquemática del shARN específico contra el receptor LOX-1.....	63
Figura 9: Obtención del plasmidio pLKO-shOLR1.....	64
Figura 10: Secuenciación del plasmidio pLKO-shOLR1 y alineamiento con el plasmidio parental pLKO.1.....	65
Figura 11: Expresión del receptor LOX-1 en células HEK293-LOX-1(+) transfectadas con el plasmidio pLKO-shOLR1.	67
Figura 12: Expresión del receptor LOX-1 en células de CCR transducidas con vector lentiviral codificante para shOLR1.....	68
Figura 13. Generación y caracterización de LDL oxidada.	69

Figura 14. Viabilidad de las células de CCR incubadas con concentraciones crecientes de LDLox.	70
Figura 15. Expresión del receptor LOX-1 en células de CCR tratadas con concentraciones crecientes de LDLox.	71
Figura 16: Niveles de expresión relativos del ARNm del receptor LOX-1 en células de CCR con expresión reducida del receptor y tratadas con LDLox.....	72
Figura 17: Viabilidad de las células de CCR incubadas con concentraciones crecientes de TNF- α por 24 h.	73
Figura 18: Expresión del receptor LOX-1 en las células HCT116 y COLO320 tratadas con concentraciones crecientes de TNF- α	74
Figura 19: Efecto del TNF- α sobre la expresión de LOX-1 en las células HCT116 y COLO320.....	75
Figura 20: Efecto del tratamiento combinado de TNF- α y LDLox sobre la expresión del receptor LOX-1 en las células HCT116, HCT-LOX(-), COLO320 y COLO-LOX(-).....	77
Figura 21. Linealidad de ensayo de MTT.....	78
Figura 22: Proliferación de células de cáncer colorrectal tratadas con concentraciones crecientes de LDLox evaluado por MTT.	80
Figura 23: Proliferación de células de cáncer colorrectal tratadas con concentraciones crecientes de LDLox (azul de tripán).	81
Figura 24: Proliferación de células de cáncer colorrectal tratadas con TNF- α y LDLox (azul de tripán).....	83

Figura 25: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en las células HCT116.	84
Figura 26: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en las células COLO320.	85
Figura 27: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de Vimentina, E-Cadherina y N-Cadherina en células HCT116 y COLO320.	89
Figura 28: Niveles de expresión relativos de marcadores de TEM en células de CCR con expresión apagada del receptor y tratadas con LDLox.	90
Figura 29: Niveles de expresión relativos de marcadores de TEM en células de CCR con expresión apagada del receptor y tratadas con LDLox.	91
Figura 30: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular y VEGF en las células HCT116 y COLO320.	93
Figura 31: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de MMP2 y VEGF en células HCT116 y COLO320.	95
Figura 32: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 en células HCT116 y COLO320.	96
Figura 33: Niveles de expresión relativos de metaloproteinasas de matriz extracelular y VEGF en células de CCR con expresión apagada del receptor y tratadas con LDLox.	98
Figura 34: Efecto del TNF- α , LDLox y cotratamiento sobre la migración de las células HCT116 y COLO320.	99

Figura 35: Efecto del TNF- α , LDLox y cotratamiento sobre la invasión de las células COLO320..... 100

Figura 36: Crecimiento de organoides de colon humano tratados con concentraciones crecientes de LDLox. 102

Figura 37: Crecimiento de organoides de colon humano tratados con LDLox e inhibidores de la formación de ROS. 104

Figura 38: Esquema integrativo de la función propuesta del receptor LOX-1 en la progresión de cáncer colorrectal y su relación con TNF- α 124



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tipos de lipoproteínas y su composición	2
Tabla 2: Anticuerpos primarios.	35
Tabla 3: Anticuerpos Secundarios.	36
Tabla 4: Condiciones de hibridación.	44
Tabla 5: Secuencia de partidores.	52



ABREVIATURAS

µg: microgramo.

µL: microlitro.

µM: micromolar.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

BSA: albúmina de suero bovina.

GFP: proteína verde fluorescente.

h: hora.

HBSS: solución salina equilibrada de Hank (del inglés Hank's Balanced Salt Solution).

mg: miligramo.

min: minuto.

mL: mililitro.

nm: nanómetro.

PPM: patrón de peso molecular.

s: segundo.

U: unidades.



RESUMEN

La obesidad, la dislipidemia y las enfermedades inflamatorias del intestino son factores de riesgo para desarrollar cáncer colorrectal. Estas afecciones también se han relacionado con niveles plasmáticos elevados de lipoproteína de baja densidad oxidada y con un estado inflamatorio con niveles elevados de citoquinas proinflamatorias. La investigación actual ha demostrado una relación significativa entre la inflamación provocada por la obesidad y el desarrollo y la progresión del CCR.

Los niveles de expresión del receptor de LDL oxidada LOX-1, un receptor ampliamente estudiado en la aterosclerosis, se han relacionado con la progresión del cáncer en el cáncer prostático, gástrico, pancreático y colorrectal; sin embargo, los mecanismos que subyacen a la progresión del CCR inducida por la LDLox y la relación entre los marcadores proinflamatorios, LDLox/LOX-1 y cáncer colorrectal no están completamente aclarados. Nuestros resultados demuestran que el receptor LOX-1 se expresa en las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116 y COLO320. Además, encontramos que el ARNm de LOX-1 está sobreexpresado en carcinomas colorrectales y adenocarcinomas en comparación con el tejido de colon normal en microarreglos depositados en bases de datos públicas. Demostramos que el tratamiento de líneas de células colorrectales con el TNF- α y la LDLox aumentó la expresión del receptor LOX-1 y que el silenciamiento de LOX-1 anuló este efecto. Además, ambas líneas celulares tratadas con LDLox proliferaron dependiendo de la dosis empleada. Además, la LDLox estimuló la proliferación y la viabilidad de organoides humanos de tejido colónico no transformado también de manera dosis-dependiente, un efecto parcialmente mediado por ROS.

Además, demostramos que la activación de LOX-1 por la LDLox induce la expresión de marcadores pro-angiogénicos como MMP2, MMP7, MMP9 y VEGF. La activación de LOX-1 por la LDLox también promueve la transición epitelial a mesenquimal de las células de cáncer colorrectal humano, caracterizada por una expresión reducida del marcador epitelial E-cadherina y una mayor expresión de marcadores mesenquimales como Vimentina, N-Cadherina, TWIST, ZEB1 y ZEB2. Además, determinamos que la LDLox promueve la invasión y migración de células de cáncer colorrectal. Sin embargo, el tratamiento conjunto de las células de cáncer colorrectal con TNF- α y LDLox no mostró un efecto aditivo.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la activación de LOX-1 por la LDLox estimula la progresión tumoral de las células de cáncer colorrectal humano, mediante la inducción de una reprogramación de la transcripción de genes implicados en la angiogénesis, invasión, migración y proliferación celular.

SUMMARY

Obesity, dyslipidemia and inflammatory bowel diseases are risk factors to develop colorectal cancer. These conditions have also been related to increased levels of plasmatic oxidized low-density lipoprotein and to an inflammatory state with increased levels of proinflammatory cytokines. Current research has consistently evidenced a significant relationship between obesity-driven inflammation with CRC development and progression.

The expression levels of the oxidized LDL receptor LOX-1, a widely studied receptor in atherosclerosis, have been related to cancer progression in prostatic, gastric, pancreatic and colorectal cancer; however, the mechanisms underlying oxLDL-induced progression of CRC, and the relationship among pro-inflammatory markers, oxLDL/LOX-1 and CRC are not completely elucidated. Our results demonstrate that LOX-1 receptor is expressed in the colorectal cancer cell lines HCT116 and COLO320. Additionally, we found in microarrays data deposited in public databases that LOX-1 mRNA is over-expressed in colorectal carcinomas and adenocarcinomas compared with normal colon tissue. We demonstrate that treatment of colorectal cell lines with TNF- α and oxLDL augmented LOX-1 expression and that LOX-1 silencing abrogated this effect. Moreover, both cell lines treated with oxLDL proliferated in a dose-dependent manner. Importantly, oxLDL stimulated human organoids proliferation and viability also in a dose-dependent manner, an effect partly mediated by ROS.

Furthermore, we demonstrated that activation of LOX-1 by oxLDL induced the expression of angiogenic markers such as MMP2, MMP7, MMP9 and VEGF. LOX-1 activation by oxLDL also promotes epithelial to mesenchymal transition of human colorectal cancer cells, characterized by reduced expression of the epithelial marker E-cadherin and increased expression of mesenchymal markers such as Vimentin, N-Cadherin, TWIST, ZEB1 and ZEB2. In addition, we determined that oxLDL promotes invasion and migration of colorectal cancer cells. Nevertheless, co-treatment of colorectal cancer cells with TNF- α and oxLDL did not show an additive effect.

Summarizing, our results suggest that LOX-1 activation by oxLDL stimulates tumor progression of human colorectal cancer cells, through the induction of a transcription reprogramming of genes involved in angiogenesis, invasion, migration and cell proliferation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1- Lipoproteína de baja densidad. Estructura, modificaciones oxidativas y receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada

1.1.1- Lipoproteína de baja densidad, estructura y función

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares que transportan los lípidos en la circulación sanguínea. Están compuestas por un núcleo central hidrofóbico de lípidos no polares, principalmente ésteres de colesterol y triglicéridos, rodeado por una capa anfipática de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas. Las lipoproteínas plasmáticas se clasifican según su densidad de flotación, tamaño, composición lipídica y de apolipoproteínas (Tabla 1)¹. El metabolismo de estas partículas está determinado por las apolipoproteínas, receptores específicos, enzimas y proteínas de transferencia¹.

La lipoproteína de baja densidad (LDL) transporta colesterol y ésteres de colesterol en la circulación sanguínea y constituye la principal lipoproteína que media la incorporación de colesterol exógeno a las células. La LDL se forman como resultado del metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de densidad intermedia (IDL). Cada partícula de LDL contiene una molécula de la apolipoproteína B-100 (Apo B-100). La LDL circulante consiste en un espectro de partículas que varían en tamaño y densidad¹, es reconocida por el receptor de LDL a través de la Apo B-100 e internalizada por endocitosis mediada por vesículas de clatrina².

Tabla 1: Tipos de lipoproteínas y su composición

Lipoproteína	Densidad de flotación (g/mL)	Tamaño (nm)	Principales lípidos	Principales apolipoproteínas
Quilomicrones	<0,93	75 -1200	Triglicéridos	Apo B-48, Apo C, Apo E, Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV
Remanentes de quilomicrones	0,930 - 1,006	30 - 80	Triglicéridos Colesterol	Apo B-48, Apo E
VLDL	0,930 - 1,006	30 - 80	Triglicéridos	Apo B-100, Apo E, Apo C
IDL	1,006 - 1,019	25 - 35	Triglicéridos Colesterol	Apo B-100, Apo E, Apo C
LDL	1,019 - 1,063	18 - 25	Colesterol	Apo B-100
HDL	1,063 - 1,210	5 - 12	Colesterol Fosfolípidos	Apo A-I, Apo A-II, Apo C, Apo E
Lp (a)	1,055 - 1,085	≈ 30	Colesterol	APOB-100, APO (a)

Fuente: extraída y modificado de Feingold y Grunfeld, 2000.

Un nivel elevado de LDL en sangre constituye un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis³. Es frecuente encontrar niveles elevados de LDL pequeñas y densas en personas con hipertrigliceridemia, niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL), obesidad, diabetes tipo 2 y en algunos estados infecciosos e inflamatorios⁴⁻⁶. Las partículas pequeñas y densas de LDL se consideran más pro-aterogénicas que las partículas grandes de LDL. Estas partículas tienen una afinidad reducida por el receptor de LDL¹, por lo que permanecen más tiempo en la circulación plasmática; atraviesan con mayor facilidad la pared arterial y se unen ávidamente a los proteoglicanos de matriz extracelular⁶. Finalmente, son más susceptibles a la oxidación, lo que podría implicar una captación mayor por las células que expresan los diferentes receptores que reconocen la forma oxidada de la LDL (LDLox)⁶.

1.1.2- Modificaciones oxidativas de la lipoproteína de baja densidad

Los componentes de la LDL se pueden oxidar por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos⁷. La oxidación de la LDL genera partículas con rangos variables de modificaciones químicas ya que este proceso depende de varios factores. La composición química de la partícula, sobre todo el contenido de antioxidantes y de ácidos grasos poliinsaturados, influye en el grado de oxidación y la naturaleza de los productos de oxidación que se forman⁷. Además, un factor fundamental que repercute en este proceso es la concentración y el origen de las moléculas oxidantes que se encuentran en el microambiente local donde ocurre el proceso oxidativo⁸. Se desconoce la ubicación anatómica exacta donde ocurre este proceso en el organismo, pero se cree que el aumento de la permeabilidad del endotelio activado facilita la acumulación de LDL circulante en el espacio intersticial o subendotelial donde puede oxidarse⁹.

En condiciones de estrés oxidativo, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son el sustrato principal de la peroxidación lipídica. Los agentes oxidantes al reaccionar con los PUFA de la LDL generan hidroperóxidos y producto del reordenamiento de los dobles enlaces se forman dienos conjugados^{8,9}. También se generan varios productos finales como aldehídos de cadena corta, principalmente malondialdehído y 4-hidroxinonenal^{8,9}. Estos aldehídos reaccionan con las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína Apo B-100 formando aductos⁹. Además, durante el proceso de oxidación la cadena

polipeptídica de esta proteína puede fragmentarse y las cadenas laterales de los aminoácidos pueden entrecruzarse⁹.

La modificación oxidativa de la LDL genera una lipopartícula con un alto contenido de cargas negativas que no es reconocida por el receptor de LDL⁸. Esta lipoproteína modificada se denomina LDL oxidada y es reconocida e internalizada por los receptores *scavengers*⁹.

1.2- Identificación, regulación y funciones fisiológicas del receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada

El receptor 1 de la lipoproteína de baja densidad oxidada similar a la lectina (LOX-1) es una glicoproteína de membrana de tipo II con un tamaño de 32 kDa codificado por el gen *OLR-1*. Esta proteína fue identificada por Sawamura y cols. en 1997 como el principal receptor de LDLox en las células del endotelio vascular¹⁰. LOX-1 pertenece a la familia de las lectinas de tipo C y ha sido clasificado como miembro de la familia de receptores *scanvengers*¹¹.

LOX-1 está compuesto estructuralmente por cuatro dominios: un dominio citoplasmático N-terminal corto, un dominio de transmembrana, un dominio cuello y un dominio extracelular C-terminal tipo lectina-C (CTLD) que interactúa con la LDLox¹²(Figura 1A). Los aminoácidos (aa) fundamentales para la unión de LDLox a este receptor se identificaron por estudios de mutagénesis dirigida determinándose que los aa básicos del dominio CTLD son imprescindibles para unir la lipopartícula^{12,13}.

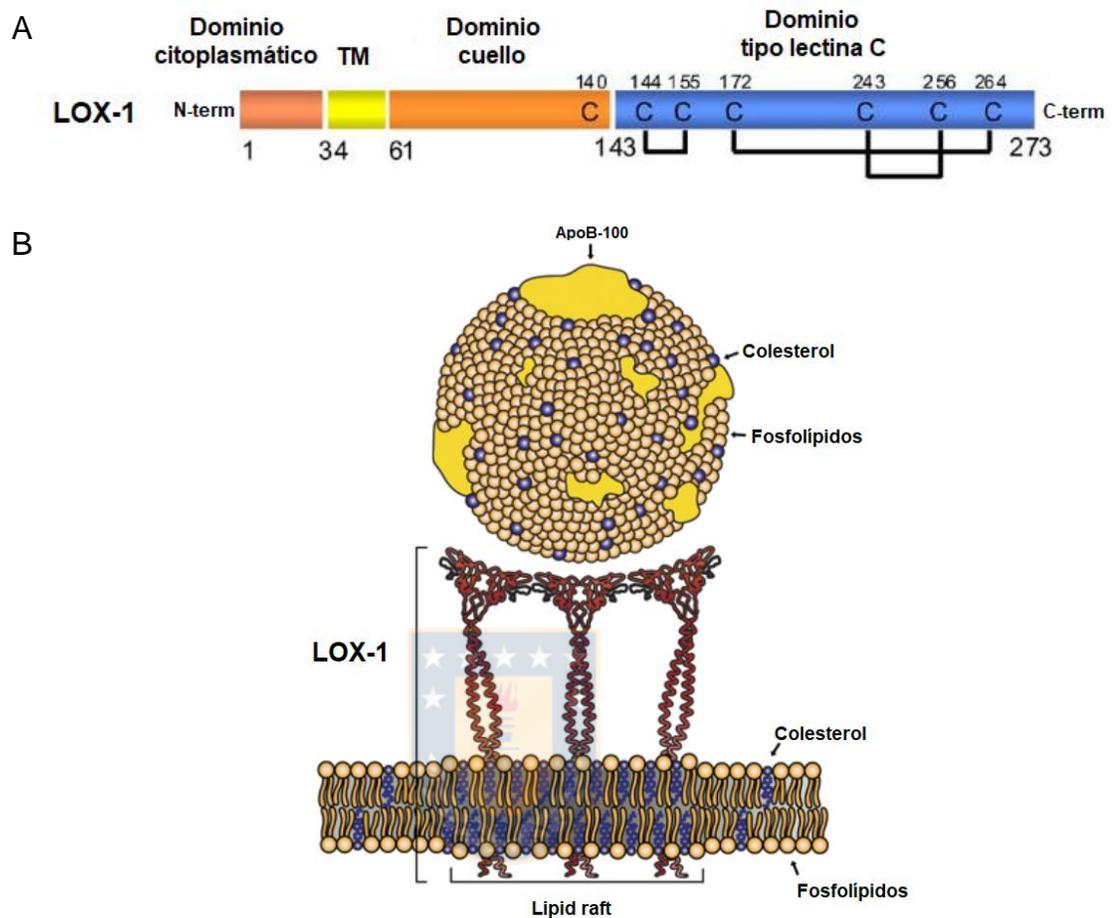


Figura 1: Estructura del receptor LOX-1 y unión de LDL oxidada. A) Representación esquemática de la estructura del receptor LOX-1: Las cajas de colores representan los 4 dominios del receptor. Se muestran las posiciones de los aa cisteína (C) que forman puentes disulfuro intracatenarios y la cisteína 140 en la región cuello que forma el puente disulfuro intercatenario. Los números debajo de las cajas de colores indican la posición de los aa de cada dominio. TM: dominio transmembrana. **B)** Representación de la unión de LDLox por el receptor LOX-1: El receptor LOX-1 presenta una conformación homodimérica y para unir e internalizar eficazmente la LDLox es primordial su localización en microdominios de membrana plasmática enriquecidos en colesterol y la formación de oligómeros hexaméricos. Fuente: modificado de Ohki y cols., 2005 y de Raniolo y cols., 2016.

LOX-1 se localiza en la membrana plasmática en forma de homodímero unido covalentemente por un puente disulfuro¹⁴. La dimerización del receptor ocurre por el dominio cuello y es indispensable para unir LDLox¹⁴. El receptor se

ensambla en oligómeros funcionales a través de interacciones no covalentes para unir con mayor avidéz la LDLox¹⁵. La oligomerización depende de la densidad del receptor en la membrana plasmática¹⁶ y su localización en microdominios enriquecidos en colesterol (*lipid rafts* en inglés) facilita la formación de los oligómeros¹⁷ (Figura 1B). La internalización de la LDLox mediado por LOX-1 ocurre mediante endocitosis dependiente de invaginaciones de caveolina¹⁸.

Las funciones del receptor LOX-1 han sido investigadas en células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas vasculares debido a su relación con la aterosclerosis¹¹. En estas células los niveles basales de expresión de LOX-1 son bajos pero aumentan por estímulos pro-inflamatorios y pro-aterogénicos como la LDLox¹⁹⁻²¹, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)²²⁻²⁴, la interleucina-1 (IL-1)^{24,25}, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)²³, lipopolisacáridos bacterianos (LPS)²⁶, endotelina-1²⁷, angiotensina II²⁸, productos terminales de glicación avanzada²⁹, proteína C reactiva³⁰ y fuerzas biomecánicas³¹(Figura 2). Estos estímulos inducen la transcripción del receptor LOX-1 mediante la unión a la región promotora del gen *OLR1* de factores transcripcionales como la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B)³².

LOX-1 es regulado a nivel postranscripcional por varios microARNs que inducen la degradación de su ARN mensajero³². Los niveles de expresión de este receptor también son regulados mediante proteólisis. El ectodominio del receptor LOX-1 es liberado al medio extracelular por la metaloproteasa asociada a membrana

ADAM10³³. Además, LOX-1 es procesado proteolíticamente en el lisosoma³⁴. Ambos mecanismos de recambio generan fragmentos N-terminales intracelulares asociados a membrana por el dominio de transmembrana del receptor. Este dominio es procesado proteolíticamente por las proteasas 2A y 2B similares a la péptido señal peptidasa (SPPL2A/SPPL2B), y los fragmentos N-terminales activan la vía de señalización intracelular de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), por lo que las proteasas SPPL2A/SPPL2B regulan negativamente la señalización de LOX-1³⁴.

La activación de LOX-1 por LDLox induce múltiples eventos que varían según el tipo celular. La regulación positiva de LOX-1 en los tejidos ateroscleróticos media la disfunción endotelial, la inflamación y la formación de células espumosas³⁵⁻³⁸. Este receptor se ha identificado en otros tipos celulares como células dendríticas³⁹, células polimorfonucleares supresoras de origen mieloide⁴⁰, plaquetas⁴¹, fibroblastos cardíacos^{42,43}, adipocitos⁴⁴ células mesangiales²⁵ y células tumorales⁴⁵⁻⁵¹. En dependencia de la concentración de LDLox y el tipo celular la activación de LOX-1 estimula la proliferación celular^{43,50,52}, la apoptosis^{21,53}, la migración celular⁵², la captación de LDLox^{26,54} y la angiogénesis^{49,55}(Figura 2).

La activación de LDLox por la LOX-1 activa diferentes vías de señalización intracelular. La unión de LDLox/LOX-1 activa la proteína miembro A de la familia de homólogos de Ras (RHOA) y la GTPasa 1 de la familia Rac (RAC1)⁵⁶. RHOA inhibe la síntesis de óxido nítrico por la enzima óxido nítrico sintasa 3/endotelial

(eNOS), mientras que RAC1 incrementa la actividad de la enzima NADPH oxidasa produciendo un aumento de los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (ROS/RNS)^{21,56}. Además, la activación de LOX-1 induce la expresión de las subunidades de la NAPH oxidasa gp91phox, p47phox y 22phox y la óxido nítrico sintasa 2/inducible (iNOS)^{21,55,57}. El bloqueo del receptor LOX-1 con un anticuerpo dirigido contra el sitio de unión del ligando o con inhibidores químicos previene estos efectos inducido por la LDLox^{55,58} (Figura 3).

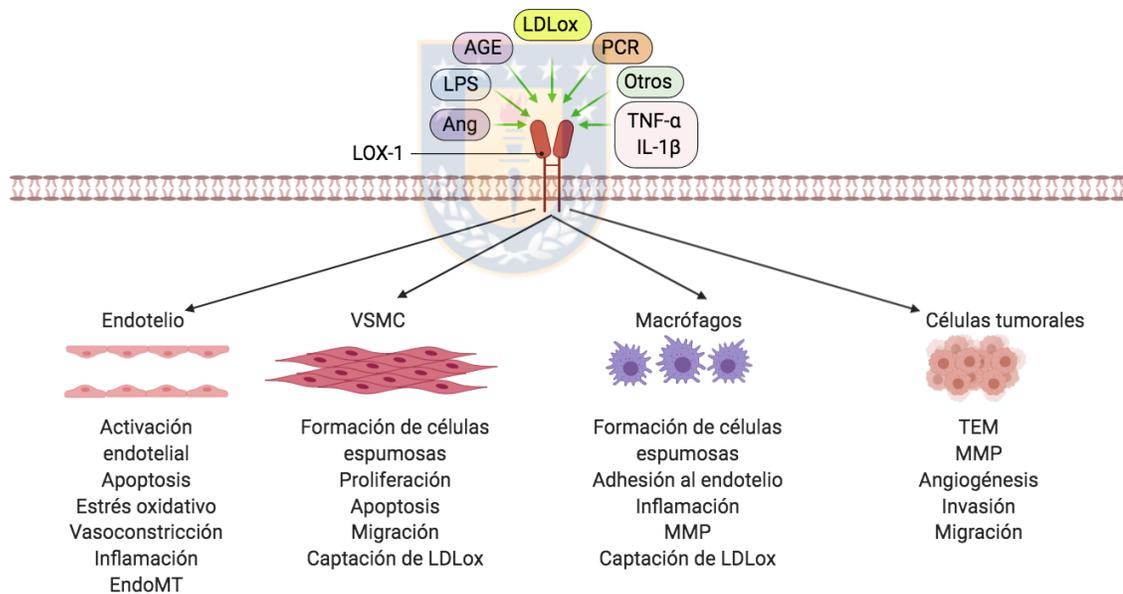


Figura 2: Estímulos inductores de la expresión del receptor LOX-1 y el efecto de su activación en distintos tipos celulares. VSCM: células musculares lisas vasculares, LPS: lipopolisacáridos, Ang: angiotensina II, AGE: productos terminales de glicación avanzados, PCR: proteína C reactiva, EndoMT: transición endotelio-mesenquimal, MMP: metaloproteinasas, TEM: transición epitelio-mesenquimal. *Fuente: elaboración propia, creado con BioRender.com.*

nitrolación de la eNOS por RNS sintetizados por iNOS⁶⁰, lo que facilita la asociación de eNOS/ β -catenina y la traslocación de la β -catenina al núcleo celular⁶⁰. En células musculares lisas, la activación de LOX-1 estimula la formación de ROS y activa las vías de quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y NF- κ B. La inhibición de estas vías con inhibidores específicos o el uso de antioxidantes disminuye la expresión del receptor LOX-1⁶¹.

Asimismo, LDLox/LOX-1 estimula la transición hacia un fenotipo mesenquimal en células endoteliales⁵⁹, células epiteliales renales de túbulo proximal⁵⁸ y células tumorales (ver 1.2.2). En células endoteliales, este cambio se caracteriza por el aumento de la expresión de los marcadores mesenquimales como Vimentina, actina alfa 2 de músculo liso (ACTA2 o α -SMA), cadherina 2 (CDH2 o N-cadherina) y fibronectina 1; y la disminución de marcadores endoteliales y epiteliales como la molécula 1 de adhesión endotelial y de plaquetas (PECAM1 o CD31), el factor de von Willebrand (VWF) y la cadherina 1 (CDH1 o E-cadherina)^{59,62}. La LDLox estimula la expresión de ACTA2 y disminuye la expresión de E-cadherina las células renales y el bloqueo del receptor LOX-1 inhibe este efecto inducido por la LDLox^{58,62}.

La interacción LDLox/LOX-1 causa la activación de la proteína quinasa C³⁵, que a su vez, estimula la expresión de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)⁶³. La activación de esta quinasa mediada por LDLox/LOX-1 está asociada a una menor expresión de desmogleína 1 y desmocolina 2. Estas dos proteínas intervienen en la formación de los desmosomas, por lo que su

disminución afecta la integridad del endotelio y aumenta la permeabilidad vascular³⁵.

La activación de LOX-1 estimula la inflamación al inducir la expresión de proteínas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento y unión de leucocitos al endotelio. La interacción entre LDLox y LOX-1 estimula la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión 1 de células vasculares (VCAM1)^{21,64}, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1)²¹ y la E-selectina²¹. La activación de LOX-1 induce la expresión del ligando 2 de quimiocinas con motivo C-C (CCL2, conocido como MCP-1)⁶⁴, el ligando 8 de quimiocinas con motivo C-X-C (CXCL8, conocido como IL-8)²¹, el TNF- α ⁴⁴ y la interleucina 6 (IL-6)⁴⁴. Un ejemplo de estos efectos se evidenció en un estudio realizado con adipocitos humanos de personas no obesas o con obesidad mórbida, en el cual la LDLox estimuló la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α e IL-6. La LDLox también indujo en estas células aumento de la expresión del receptor LOX-1 y modificó la expresión de genes involucrados en la apoptosis⁴⁴.

El receptor LOX-1 tiene actividad de molécula de adhesión en el lecho vascular: en un modelo experimental de uveítis, se observó que el tratamiento con un anticuerpo específico contra LOX-1 redujo la adhesión vascular de los linfocitos al aumentar la velocidad de rodamiento de estas células e inhibiendo su extravasación⁶⁵. Las propiedades como molécula de adhesión del receptor LOX-1 se confirmaron en un modelo de flujo sanguíneo *in vitro*. En este modelo, el

receptor LOX-1 recombinante unió células mononucleares de sangre periférica en condiciones fisiológicas de flujo sanguíneo⁶⁵.

1.2.1- LOX-1 y cáncer

Además de la abundante evidencia en la literatura que vincula LOX-1 con la aterosclerosis, otros estudios demostraron que LOX-1 está involucrado en la progresión tumoral⁴⁵⁻⁵⁰. Los niveles de expresión del receptor LOX-1 se encuentran aumentados en los tumores de diferentes tipos de cáncer en comparación con los tejidos normales^{46-48,51,66,67}. En varios de estos estudios se determinó que niveles elevados de expresión de LOX-1 correlacionan positivamente con el estadio de los tumores^{47,67-69}. Asimismo, los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier revelaron que los pacientes con niveles de expresión elevados de LOX-1 tienen menor supervivencia que los pacientes con bajos niveles de expresión de este receptor^{47,51,67}.

En varios estudios se sugiere que LOX-1 podría utilizarse como un biomarcador para pronosticar el tiempo de supervivencia de los pacientes con cáncer. En un estudio realizado con 238 muestras de pacientes con cáncer colorrectal (CCR) avanzado (grados III y IV) se encontró que los niveles del receptor LOX-1 soluble fue un marcador útil para pronosticar supervivencia. El tiempo de supervivencia de pacientes con grado III y IV de CCR y niveles elevados de LOX-1 soluble en suero fue significativamente menor que en individuos con bajos niveles de LOX-1 soluble⁷⁰. Los pacientes con altos niveles de LOX-1 tuvieron mayor cantidad de

metástasis a nódulos linfáticos⁷⁰. Además, marcadores pro-inflamatorios sistémicos, como la proteína C-reactiva y las proporciones monocito-linfocito y neutrófilo-linfocito, se encontraron significativamente más elevados en el grupo con niveles altos de LOX-1 en suero⁷⁰. La expresión de LOX-1 tiene valor de pronóstico negativo para la supervivencia en pacientes con carcinoma urotelial de vejiga⁷¹, cáncer gástrico⁴⁷ y pancreático⁴⁸.

En líneas celulares de cáncer de próstata, la activación de LOX-1 por LDLox promueve la proliferación celular y procesos angiogénicos caracterizados por una mayor expresión de VEGF, aumento de la actividad de las metaloproteinasas MMP2 y MMP9, y brotación de nuevos vasos sanguíneos⁴⁹. Además, la activación de LOX-1 por LDLox estimula la migración^{66,68} e invasión⁶⁸ de las células de cáncer de próstata.

La sobreexpresión de LOX-1 incrementa la proliferación, migración e invasión de líneas celulares de cáncer de mama⁶⁷, pancreático⁴⁸, gástrico⁴⁷ y osteosarcomas⁶⁹ en comparación con la célula parental y sin suministro exógeno de LDLox. Por otro lado, el silenciamiento de la expresión de LOX-1 o el bloqueo del receptor con un anticuerpo específico en estas células, en líneas celulares de CCR⁴⁶ y en modelos de transformación oncogénica⁴⁵ tienen un efecto contrario.

LOX-1 promueve la transición epitelio-mesenquimal (TEM) en las células tumorales. Los niveles de expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, proteína ZO-1 y placoglobina disminuyen en células que

sobreexpresan LOX-1 o en células tratadas con LDLox; mientras que aumentan en células con niveles de expresión reducidos del receptor LOX-1^{47,66,69}. Por otra parte, los niveles de expresión de marcadores mesenquimales como Vimentina, N-cadherina, y factores transcripcionales como Snail, Slug, y Twist están aumentados en las células que sobreexpresan LOX-1 o en células tratadas con LDLox y su expresión disminuye cuando se silencia la expresión del receptor LOX-1^{47,48,66}. La sobreexpresión o silenciamiento de LOX-1 promovió o inhibió la TEM, respectivamente, en líneas celulares de cáncer gástrico y pancreático de forma independiente de la activación del receptor LOX-1 por LDLox^{47,48}.

LOX-1 también promueve la tumorigenicidad de diferentes líneas celulares al facilitar el crecimiento independiente de anclaje o aumentar la capacidad metastásica de las células^{45,66}. En modelos animales de xenoinjertos con células tumorales de cáncer de próstata⁶⁶, pulmón⁷², mama⁴⁵ y CCR⁷³, la inhibición de la expresión del receptor LOX-1 con siRNA^{45,66,73} o con un anticuerpo neutralizante contra LOX-1⁷² inhibe el crecimiento tumoral o la metástasis^{45,66,72,73}.

Por otra parte, las propiedades de molécula de adhesión de LOX-1 podría favorecer la migración y metástasis de las células tumorales. La expresión aumentada de LOX-1 en células endoteliales humanas mediada por la acción de TNF- α , incrementa la migración transendotelial de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231²². Además, la inhibición de la expresión de LOX-1 en células endoteliales con un siARN específico para *OLR1* o con un anticuerpo neutralizante inhibe la adhesión y la migración transendotelial de las células de

cáncer de mama HCC1142, respectivamente⁷⁴. En general, la evidencia actual sugiere que LOX-1 es un factor relevante en el desarrollo y la progresión tumoral.

1.3- Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es una de las principales causas de muerte por cáncer en todo el mundo. En el año 2020, ocasionó más de 900 000 muertes anuales y su incidencia se estimó en más de 1,9 millones de casos⁷⁵. A nivel mundial, el CCR es el tercer cáncer con mayor incidencia en hombres (10,6 % del total de casos de cáncer) y el segundo en mujeres (9,4 % del total de casos de cáncer)⁷⁵. En Chile, en el año 2015, la tasa de mortalidad ajustada para el CCR fue de 10,18 por cada 100 000 habitantes, mostrando una clara tendencia a aumentar. Entre los años 2000 al 2015, la tasa de mortalidad ajustada del CCR aumentó 1,57 puntos para el cáncer de colon y 1,12 puntos para el cáncer de recto⁷⁶. En el año 2020 la incidencia del CCR en nuestro país fue de 19,9 por cada 100 000 habitantes, ocupando el tercer lugar en incidencia entre todos los tipos de cáncer⁷⁵.

La alta incidencia del CCR se ha relacionado con la gran proliferación del epitelio del colon, donde las células de las criptas de Lieberkühn tienen una renovación rápida, lo que aumenta la probabilidad de adquirir y fijar cambios genéticos y epigenéticos en un microambiente pro-inflamatorio y pro-oxidativo⁷⁷. La acumulación de estos cambios genómicos a lo largo de la vida se relaciona con el hecho de que alrededor del 90 % de los casos de CCR son diagnosticados en

pacientes con más de 50 años de edad⁷⁸. Sin embargo, la incidencia de este cáncer ha aumentado en la última década en personas con menos de 50 años^{79,80}, y esto se ha relacionado con modificaciones en los estilos de vida, y sobre todo con el aumento de la obesidad⁸¹.

Las bases etiológicas del CCR muestran que la mayoría de los casos son esporádicos (70 a 80 %), sin antecedentes familiares conocidos de CCR⁸². Alrededor del 20 % al 30 % de los casos de CCR tienen un componente hereditario relacionado con síndromes genéticos conocidos como el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis o síndrome de Lynch, poliposis adenomatosa familiar y poliposis asociado a la ADN glicosilasa mutY⁷⁸.

La etiología exacta del CCR sigue siendo desconocida; sin embargo, su origen multifactorial está relacionado con factores genéticos, epigenéticos y ambientales⁸³. El CCR es una patología heterogénea con fenotipos moleculares diferentes, pero parcialmente superpuestos, que presentan tres formas de inestabilidad del ADN: inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad de microsatélites (MSI) y metilaciones en las islas CpG (CIMP)^{82,84}. La CIN se caracteriza por alteraciones en el número o la estructura de los cromosomas provocando la ganancia o pérdida de la función de genes asociados a tumores^{82,84}. La MSI se caracteriza por mutaciones en los genes de reparación de errores de desajuste que causan inestabilidad dentro de las regiones de microsatélites. La inserción o delección de pares de bases en las secuencias repetidas de los microsatélites durante la replicación no es reparada

correctamente, provocando un fenotipo hipermutable^{82,84}. CIMP se caracteriza por la hipermetilación de las islas de dinucleótidos de citosina/guanina unidos por enlace fosfodiéster (CpG), que cuando ocurre en regiones promotoras de genes supresores tumorales silencian su expresión⁸⁵. La acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas provoca la proliferación anormal y transformación de las células pluripotentes del colon en células cancerosas⁸³.

Las alteraciones genéticas descritas con mayor frecuencia en el CCR esporádico son mutaciones inactivadoras en genes supresores tumorales como la proteína APC reguladora de la vía de señalización WNT (*APC*), la proteína tumoral p53 (*TP53*) y el receptor 2 del factor de crecimiento transformante β (*TGFBR2*). Además, las mutaciones de ganancia de función en el protooncogén KRAS, GTPasa (*KRAS*), en el protooncogén B-Raf, serina / treonina quinasa (*BRAF*) y en la subunidad catalítica alfa de la enzima fosfatidilinositol 4,5 difosfato 3 quinasa (*PIK3CA*). Finalmente, otras alteraciones descritas son mutaciones inactivadoras en los genes de reparación de errores de desajustes, principalmente en el homólogo 1 de mutL (*MLH1*) y el homólogo 2 de mutS (*MSH2*)^{84,86}.

Recientemente, un consorcio internacional estratificó los tumores colorrectales en 4 subtipos moleculares consenso (CMS) basándose en la expresión génica⁸⁷. El CMS1 tiene características hipermutables, con alto nivel de MSI/CIMP, alta infiltración de células inmunes y *BRAF* mutado con frecuencia^{87,88}. El CMS2 se denomina el subtipo canónico porque se caracteriza por altos niveles de CIN, alta

expresión de genes blancos de la vía WNT y MYC, con TP53 mutado^{87,88}. El CMS3 se denomina el subtipo metabólico, presenta MSI moderado o bajo y CIMP intermedio, tiene mutaciones frecuentes en KRAS y se caracteriza por la activación de vías metabólicas^{87,88}. El CMS4 expresa altos niveles de genes asociados con un fenotipo mesenquimal, caracterizado por la activación de transición epitelio-mesenquimal y vía del TGF- β . Además, presenta gran infiltración de linfocitos y monocitos, un alto contenido de estroma y tiene el peor pronóstico de supervivencia^{87,88}. Aunque algunas mutaciones están presentes con mayor frecuencia en un subtipo que en otro, ninguna está presente de manera exclusiva en un CMS. La importancia de esta clasificación es que ha permitido predecir el pronóstico de los pacientes y determinar las estrategias de tratamiento^{89,90}.

1.4- Obesidad, inflamación y cáncer colorrectal

La obesidad y las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son factores de riesgo para desarrollar CCR. La obesidad es reconocida como un estado inflamatorio subclínico pero crónico. Por otra parte, la inflamación se considera actualmente un potente impulsor del CCR⁹¹⁻⁹³.

La asociación entre obesidad y CCR está respaldada por varios estudios epidemiológicos⁹⁴⁻⁹⁶. En el año 2012 se estimó que entre el 6 y el 7 % de los casos de CCR diagnosticados en todo el mundo en hombres y mujeres, respectivamente, eran atribuibles al exceso de peso corporal⁹⁷. Sin embargo, los

eventos moleculares y celulares que describen específicamente esta relación no han sido aclarados completamente. Los factores plausibles involucrados en el CCR relacionado con la obesidad derivan de las alteraciones inmunes y metabólicas inducidas por la obesidad, por ejemplo, el factor de crecimiento similar a la insulina⁹⁸, adipocinas⁹⁹ y citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6^{100,101}.

Una característica propia de la obesidad es la generación de una inflamación crónica de bajo grado en respuesta al agrandamiento del tejido adiposo, principalmente por la hipertrofia de los adipocitos, que provoca estrés del retículo endoplasmático y disfunción mitocondrial¹⁰². Este estado inflamatorio de bajo grado se caracteriza por una mayor expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, secretadas por adipocitos y células inmunes infiltradas en el tejido adiposo¹⁰². La liberación de citoquinas inflamatorias por el tejido adiposo mesentérico afecta los órganos cercanos como el intestino.

Estas moléculas participan en el inicio, desarrollo y progresión del CCR a través de la estimulación constante de vías de señalización intracelular como el transductor de señal Janus-quinasa y vía activadora de la transcripción (JAK-STAT) y NF- κ B, que inducen la proliferación y/o supervivencia de las células epiteliales intestinales (CEI)^{103,104}. Además, estas citoquinas también promueven la producción intracelular de ROS en estas células¹⁰⁵, así como la síntesis y liberación de quimocinas como CXCL8, reclutando células inmunes que liberan ROS al activarse^{104,106}. Las ROS, a su vez, pueden inducir la proliferación,

supervivencia y migración de las CEI, así como estimular la angiogénesis, mediante la activación de diversas proteínas y factores de transcripción sensibles a redox, como la fosfatidilinositol 3-quinasa / AKT serina / treonina quinasa (PI3K/AKT), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor NF- κ B, RAC1 y el VEGF^{107,108}. Además, concentraciones moderadas de ROS pueden causar daño al ADN, lo que puede conducir a la acumulación de mutaciones en las CIE¹⁰⁸. Ejemplos de esto se han constatado en varios estudios donde se ha reportado una relación positiva entre inflamación, ROS y carcinogénesis¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Otra característica distintiva de la obesidad es la alteración de los perfiles lipídicos circulantes. Los individuos obesos tienen regularmente dislipidemia caracterizada por niveles altos de triglicéridos séricos, VLDL y LDL, con niveles bajos de HDL⁶. Las dislipidemias también se han relacionado con un mayor riesgo de CCR¹¹², mientras que concentraciones altas de HDL reducen este riesgo¹¹³. Las personas obesas suelen tener niveles de LDLox más altos que las personas normopeso¹¹⁴⁻¹¹⁶ y niveles elevados de esta lipoproteína modificada se han relacionado con el riesgo de desarrollar CCR. En un estudio, donde se analizaron los niveles de LDLox en 119 casos de CCR y 316 controles, se encontró que el riesgo de desarrollar CCR aumentó en los individuos con concentraciones más altas de LDLox en suero, independientemente de los factores de confusión. Los autores concluyeron que los niveles de LDLox podrían usarse como un biomarcador para predecir el riesgo de este cáncer¹¹⁷.

En otra investigación donde se determinaron los niveles plasmáticos de LDLox, se hallaron niveles significativamente mayores de esta lipoproteína en pacientes obesos con CCR, siendo significativamente mayor en individuos con estadio avanzado de CCR. En general, los marcadores de dislipidemia, resistencia a la insulina y estrés oxidativo empeoraron en pacientes obesos con CCR¹¹⁵. En otro estudio se halló que los marcadores de estrés oxidativo, incluidos los niveles de LDLox, eran más altos en pacientes con CCR que en los controles. Además, los pacientes con pólipos no displásicos, antes de que estos progresen a CCR, tenían mayor concentración de LDLox circulantes que los individuos sanos¹¹⁸. Finalmente, en otro estudio que determinó los niveles séricos de LDLox y anticuerpos contra LDLox (ox-LAB) en 73 pacientes con CCR y 35 controles sanos no se encontraron diferencias en los niveles de LDLox entre los pacientes con CCR y los controles. Sin embargo, los niveles de anticuerpos ox-LAB fueron significativamente mayores en los pacientes con CRC que en el grupo control¹¹⁹. Estos datos sugieren que altos niveles de LDLox pueden aumentar el riesgo de desarrollar CCR, pero dado el número reducido de casos evaluados (389 casos en total) y los resultados contradictorios, estos hallazgos deben corroborarse en cohortes más amplias.

Los pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales tienen una tendencia conocida a desarrollar CCR asociado a colitis (CAC). El desarrollo de CAC está estrechamente relacionado con la gravedad, el alcance y la duración de la inflamación intestinal¹²⁰. La secuencia de mutaciones genéticas que ocurren en

el desarrollo de CAC difiere de la secuencia del CCR esporádico (Figura 4)¹²⁰. Por ejemplo, las mutaciones en el gen *APC* ocurren en los primeros estadios en el CCR esporádico, pero ocurren tardíamente en el CAC, mientras que las mutaciones en el gen *TP53* son un evento temprano en CAC y tardío en CRC^{120,121}. Las evidencias actuales indican que hay diferencias adicionales en las características mutacionales del CAC y el CRC esporádico^{122,123}.

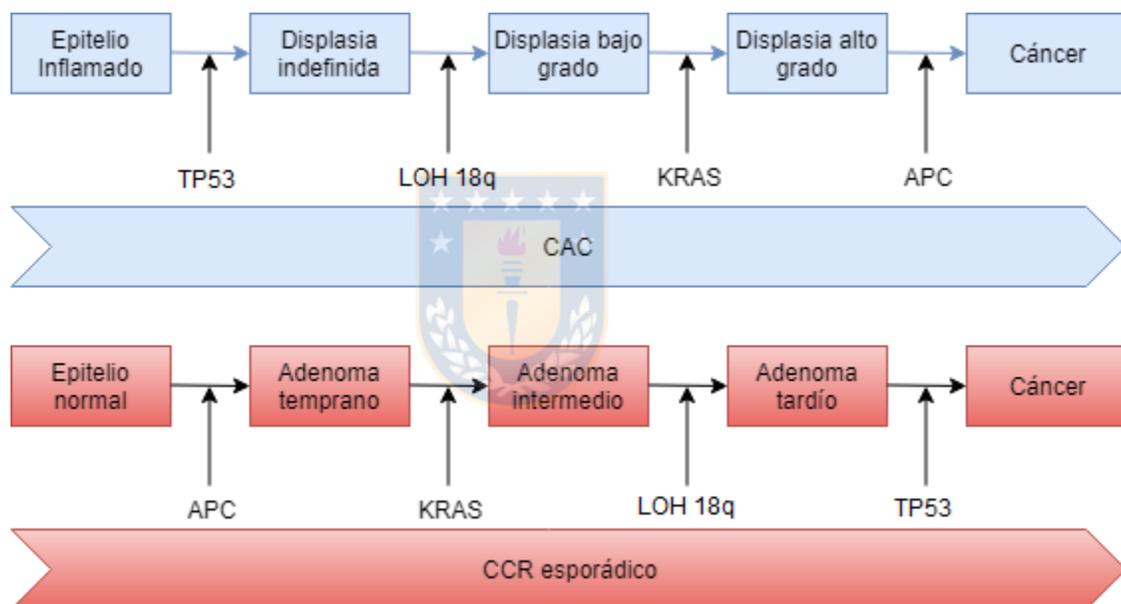


Figura 4: Proceso tumorigénico del cáncer colorrectal esporádico y el cáncer colorrectal asociado a colitis. Secuencia adenoma-carcinoma del CCR esporádico vs CAC. Las mutaciones en el gen *APC* es un evento temprano en el CCR esporádico y tardío en el CAC. El gen *TP53* sigue un patrón opuesto. LOH 18q: pérdida de heterocigosidad en el brazo q del cromosoma 18. Fuente: modificado de Chandrasinghe y cols., 2018.

A pesar de que las EII se caracterizan por un mayor estrés oxidativo, existen resultados contradictorios respecto a los niveles de LDLox. Algunos estudios reportaron niveles aumentados de LDLox y anticuerpos contra LDLox, pero otros

informan niveles bajos de LDLox, probablemente porque los pacientes con EII frecuentemente tienen hipocolesterolemia¹²⁴⁻¹²⁶. Sin embargo, las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, un marcador de la peroxidación lipídica, aumentaron en estos y otros estudios^{125,127,128}. En general, existe poca información en la literatura sobre los niveles de LDLox en pacientes con EII.

Por otro lado, los niveles séricos de LDLox pueden no reflejar la concentración local en sitios inflamados. El sistema microvascular intestinal en pacientes con EII muestra una mayor permeabilidad^{129,130}, por lo tanto, se considera que aumente la extravasación de lipoproteínas y su retención en el espacio de la matriz extracelular. La retención de LDL por proteoglicanos promueve modificaciones oxidativas de las partículas de LDL³. Además, el entorno oxidativo debido a la inflamación podría favorecer la oxidación de las LDL. Las modificaciones oxidativas de LDL se producen por la exposición a ROS como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los productos de la mieloperoxidasa¹³¹. Por tanto, la existencia de un estado inflamatorio crónico servirá como combustible para acelerar las modificaciones oxidativas de las LDL.

El TNF- α es una de las principales citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria. Aunque se identificó por primera vez como un agente antitumoral, actualmente se reconoce como una citoquina promotora de tumores que relaciona la inflamación y el cáncer¹³². En términos generales, el TNF- α puede activar vías de señalización intracelular que conducen a tres respuestas celulares diferentes: supervivencia, proliferación o muerte celular¹³³. La función del TNF- α

en la formación y progresión de tumores colorrectales es compleja y los resultados experimentales son contradictorios. En algunos estudios el TNF- α estimula la formación y progresión de tumores colorrectales^{134,135} mientras que en otros tiene un efecto protector^{136,137}.

La expresión elevada de esta molécula constituye una característica común de las EII, los sujetos obesos y de modelos animales de EII y obesidad¹³⁸⁻¹⁴². Varias evidencias respaldan la relevancia de esta citoquina en el desarrollo y la progresión del CCR. En un estudio de casos y controles, los niveles más altos de citoquinas pro-inflamatorias, incluido el TNF- α , se asociaron positivamente con la prevalencia de adenomas colorrectales¹⁰⁰. Además, los pacientes con CCR que presentan niveles séricos bajos de TNF- α tienen una tasa de supervivencia significativamente mayor que los pacientes con niveles altos de TNF- α ¹⁴³. Asimismo, pacientes con EII tratados con agentes anti-TNF- α tienen menor probabilidad de desarrollar CCR¹⁴⁴.

En este mismo sentido, los leucocitos infiltrantes de tumores (TIL) de muestras humanas de CCR esporádicos potencian el crecimiento de líneas celulares de CCR humano. Estos TIL producen grandes cantidades de citoquinas, incluido el TNF- α . La neutralización de las citoquinas que activan las vías de señalización de NF- κ B y STAT3 reduce el efecto mitógeno de los sobrenadantes de TIL sobre las líneas celulares de CCR¹⁴⁵. Además, el TNF- α estimula la migración e invasión de las células de CCR HCT116^{146,147}.

Finalmente, en varios modelos murinos de CCR se ha demostrado la importancia del TNF- α en la homeostasis del tejido colónico, en la colitis y en el desarrollo y progresión de tumores colorrectales^{134,135,148}. La evidencia actual sugiere que el TNF- α es un factor relevante para el desarrollo y la progresión del CCR.

En resumen, las neoplasias colorrectales están relacionadas con las enfermedades inflamatorias intestinales y la obesidad. En Chile, donde la esperanza de vida aumentó hasta alcanzar los 79,5 años, se ha observado un incremento en la incidencia del CCR. Consecuentemente, esta patología ha adquirido mayor importancia como problema de salud pública. Por otra parte, el 74 % de la población chilena tiene sobrepeso u obesidad. Eso sitúa a Chile como el segundo país en el mundo con la mayor tasa de obesidad y sobrepeso en su población adulta. La obesidad y el sobrepeso van acompañados por un aumento de moléculas promotoras de la inflamación. Teniendo en cuenta estos factores es necesario estudiar los mecanismos moleculares que vinculan la obesidad y la inflamación crónica con la progresión del CCR.

Los antecedentes presentados se pueden resumir en las siguientes afirmaciones:

- 1) Las citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α , inducen la expresión del receptor LOX-1.

2) La obesidad y las enfermedades inflamatorias intestinales son factores de riesgo para desarrollar CCR, y en estas condiciones de salud, se incrementan los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y marcadores de estrés oxidativo.

3) Los niveles elevados de LDLox se han relacionado con cáncer colorrectal.

4) LOX-1 se sobreexpresa en muestras de tejido de cáncer de mama, gástrico, pancreático y colorrectal.

5) La activación de LOX-1 estimulan la transición epitelio mesenquimal, migración, invasión, angiogénesis y tumorigenicidad de diferentes células tumorales.

Hasta donde conocemos, los mecanismos que relacionan la progresión del CCR inducida por la LDLox no están dilucidados. Además, aún no se ha estudiado la influencia de la activación del receptor LOX-1 por la LDLox en este tipo de cáncer ni el efecto de esta activación en un entorno pro-inflamatorio en el desarrollo de CCR.

En este trabajo hipotetizamos que el TNF- α induce un aumento en los niveles de expresión del receptor LOX-1 en células de CCR y que la activación del receptor LOX-1 por la LDLox promueve la progresión del CCR mediante la estimulación del crecimiento celular, la modulación de marcadores de transición epitelio-mesenquimal, la migración e invasión celular.

2. HIPÓTESIS

El factor de necrosis tumoral alfa aumenta la expresión del receptor LOX-1 en células humanas de cáncer colorrectal y la activación de este receptor por su ligando, la LDL oxidada, promueve la progresión tumoral de cáncer colorrectal.



3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo general

Determinar la relación existente entre el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la expresión y activación del receptor LOX-1, y la progresión tumoral del cáncer colorrectal.

3.2- Objetivos específicos



1. Determinar el efecto del tratamiento con TNF- α y LDL oxidada en los niveles de expresión del receptor LOX-1 y la proliferación de modelos celulares de cáncer colorrectal humano (HCT116 y COLO320) y organoides humanos de colon.

2. Determinar la función del receptor LOX-1 sobre marcadores pro-angiogénicos y de transición epitelio-mesenquimal en modelos celulares de cáncer colorrectal humano (HCT116 y COLO320).

3. Establecer la relevancia del TNF- α y la activación del receptor LOX-1 en la migración e invasión en células humanas de cáncer colorrectal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1- Materiales

- Biorad: cubetas de electroporación de 0,1 cm (1652089).
- Corning: placas de 100 mm (430167), placas de 12 pozos (3513), placas de 24 pozos (3526), placas de 6 pozos (3516), placas de 96 pocillos (353072).
- Jet Biofil: filtros de 0,22 μm (FMC201030), filtros de 0,45 μm (FMC401030), frascos de cultivo T-75 (TCF012250), frascos de cultivo T-82 (TCF012600).
- Marienfeld: cubreobjetos redondos $\text{Ø}=12$ mm (0111520), portaobjetos (1000200).
- SSIbio: tubos de PCR en tiempo real, tiras de 8 pozos (3145-00).



4.2- Reactivos químicos

Los reactivos químicos se describen en la metodología y en el Anexo 1.

4.3- Líneas celulares y bacterias

Todos los procedimientos y protocolos que involucraron líneas celulares y muestras de sangre fueron revisados y aprobados por el comité institucional de Bioética de la Universidad de Concepción.

4.3.1- Células COLO320

Las células COLO320 (ATCC; CCL-220) se cultivaron en frascos T-75 o placas de 100 mm en medio RPMI (Gibco, 31800-089) suplementado con 1 mM de glutamina (HyClone, SH30034.01), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de

estreptomina (HyClone, SV30010) y 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Biological Industries, 04-127-1A). Estas células fueron donadas por el laboratorio del Dr. A. Castro (Facultad de Ciencias Biológicas, UDEC).

4.3.2- Células HCT116

Las células HCT116 (ATCC; CCL-247) se cultivaron en frascos T-75 o placas de 100 mm en medio DMEM (Gibco, 12800-082) suplementado con 1 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 10 % de SFB. Estas células fueron donadas por el laboratorio del Dr. A. Castro (Facultad de Ciencias Biológicas, UDEC).

4.3.3- Células HEK293FT

Las células HEK293FT (ThermoFisher Scientific; R70007) se cultivaron en frascos T-75 o placas de 100 mm con medio DMEM suplementado con 1 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 10 % SFB.



4.3.4- Células HEK293-LOX

Las células HEK293-LOX sobreexpresan el receptor LOX-1. Se cultivaron en placas de 60 mm con medio DMEM suplementado con 1 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 10 % de SFB.

4.3.5- Células L-WRN y formulación de medio WRN completo

Las células L-WRN secretan las proteínas WNT3A, RSPO3 (R-espondina 3) y NOG (nogina) al sobrenadante de cultivo¹⁴⁹ (ATCC; CRL-3276). Estas células se

emplearon para obtener el medio condicionado WRN que se utilizó en los cultivos de organoides intestinales.

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 500 µg/mL de higromicina (Gibco, 10687010), 500 µg/mL de G418 (Corning, 61-234-RF), 1 mM de L-glutamina y 10 % de SFB. Para la obtención del medio condicionado, las células se cultivaron en frascos T-182 con medio Advanced DMEM/F12 (Gibco, 12634-010), sin los antibióticos de selección, con 20 % de SFB, 10 mM de HEPES (Sigma, H6147), 2 mM de glutaMAX (Gibco, 35050-061), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. El sobrenadante del cultivo se colectó cada 2 días por 10 días. El sobrenadante se centrifugó a 1400 g, se filtró por 0,22 µm y se diluyó 1/2 con medio Advanced DMEM/F12 suplementado con 20 % de SFB, 2 mM de glutaMAX, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (50 % de medio condicionado, medio WRN). Se realizaron alícuotas en tubos de 50 mL que se conservaron a -70 °C.

Medio WRN completo: 50 % de medio condicionado WRN suplementado con B-27 (Gibco, 17504-044), 10 mM de Nicotinamida (Santa Cruz Biotechnology, sc-208096), 10 nM de Gastrina I (Sigma-Aldrich, G9145), 50 nM de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (R&D Systems, 236-EG-200), 500 nM de A 83-01 (Santa Cruz Biotechnology, sc-203791), 10 µM de SB202190 (Santa Cruz Biotechnology, sc-202334A), 10 µM de Thiazovivin (Cayman Chemical, CAY-14245), 5 µM de CHIR99021 (Cayman Chemical, CAY-13122) y 100 µg/mL de primocin (Invivogen, ant-pm-1).

4.3.6- Células HEK293-R-espondina 2

Las células HEK293-R-espondina 2¹⁵⁰ secretan la proteína RSPO2 al sobrenadante de cultivo. Estas células se cultivaron para obtener el medio condicionado R-espondina 2 que se utilizó para formular el medio de cultivo RENC.

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 300 µg/mL de zeocina (Invivogen, ant-zn-1), 10 % de SFB y 1 mM de L-glutamina. Para obtener el medio condicionado, las células se cultivaron 8 días en frascos T-182 con medio Advanced DMEM/F12 sin el antibiótico de selección, 20 % de SFB, 10 mM de HEPES y 2 mM de glutaMAX. El sobrenadante del cultivo se colectó y se centrifugó a 1400 g, se filtró por 0,22 µm y se realizaron alícuotas en tubos de 15 mL que se conservaron a -70 °C.

4.3.7- Células HEK293/nogina y formulación de medio RENC

Las células HEK293/nogina¹⁵¹ secretan la proteína NOG al sobrenadante de cultivo. Estas células se cultivaron para obtener el medio condicionado nogina que se utilizó para formular el medio de cultivo RENC.

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10 µg/mL de puromicina (Invivogen, ant-pr-1), 10 % de SFB y 1 mM de L-glutamina. Para obtener el medio condicionado, las células se cultivaron 8 días en frascos T-182 con medio Advanced DMEM/F12 sin el antibiótico de selección, 20 % de SFB, 10 mM de HEPES y 2 mM de glutaMAX. El sobrenadante del cultivo se colectó y se

centrifugó a 1400 g, se filtró por 0,22 µm y se realizaron alícuotas en tubos de 15 mL que se conservaron a -70 °C.

Medio RENC: Advanced DMEM/F12, suplementado con 10 % (v/v) de medio condicionado nogina, 10 % (v/v) de medio condicionado R-espondina 2, B-27, 10 mM de Nicotinamida, 10 nM de Gastrina I, 50 nM de EGF, 500 nM de A 83-01, 10 µM de SB202190, 5 µM de CHIR99021 y 100 µg/mL de primocin.

4.3.8- Top10F'

Las bacterias Top10F' se utilizaron para amplificar los plasmidios utilizados y presentan el siguiente genotipo: F'[*lacI*^qTn10(Tet^R)] *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*.

4.4- Plasmidios

pLP1: 8889 pb. Plasmidio utilizado para obtener los vectores lentivirales. Codifica para una poliproteína de fusión de los genes *gag* y *pol* del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El gen *gag* codifica para las proteínas estructurales de las partículas lentivirales y el gen *pol* codifica las enzimas requeridas para la replicación e integración de los vectores lentivirales. Además, codifica para el elemento RRE que permite la expresión de los genes *gag* y *pol* de manera dependiente de la proteína Rev. El plasmidio codifica para el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina (Anexo 2).

pLP2: 4180 pb. Plasmidio utilizado para obtener los vectores lentivirales. Codifica para la proteína Rev que interactúa con el elemento RRE presente en pLP1 y estimula la expresión de la poliproteína Gag/Pol. Además, promueve la exportación nuclear del ARN viral sin procesamiento para ser empacado en los vectores lentivirales. El plasmidio codifica para el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina (Anexo 2).

pLP-VSVG: 5821 pb. Plasmidio utilizado para obtener los vectores lentivirales. Codifica para la glicoproteína de envoltura G del virus de la estomatitis vesicular que permite la obtención de virus seudotipados con un amplio rango de hospedero. El plasmidio codifica para el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina (Anexo 2).

pLKO.1¹⁵²: 7050 pb. Plasmidio utilizado para la clonación de una secuencia de ADN codificante para un shARN específico para el gen *OLR1*. Contiene el promotor del gen *RNU6-1* (ARN nuclear pequeño U6) que permite la expresión de shARN. Una región de clonamiento con las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *AgeI* y *EcoRI* para insertar el ADN codificante para shARN. Codifica para los siguientes elementos genéticos de VIH-1; a) región 5'LTR truncada, b) región 3'LTR auto-inactivadora una vez se ha insertado el ARN viral en la célula hospedera, c) secuencia ϕ empaquetadora de ARN viral, d) secuencia RRE que permite la exportación de ARN viral dependiente de la proteína Rev, e) tracto central de polipurina y secuencia de terminación central que favorecen la integración de los vectores lentivirales y la eficiencia de

transducción. El plasmidio codifica para el gen *pac* que confiere resistencia a puromicina y el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina (Anexo 2). (Addgene plasmid # 8453; <http://n2t.net/addgene:8453>; RRID:Addgene_8453).

pLKO-shOLR1: 7084 pb. Plasmidio utilizado en la generación de vectores lentivirales, derivado del clonamiento de la secuencia codificante para un shARN específico contra el gen *OLR1* en el plasmidio pLKO.1 (Figura 9).

pEGFP-C2: 4735 pb. Plasmidio que codifica una variante de la proteína verde fluorescente optimizado para lograr mayores niveles de expresión en células de mamíferos con una señal de fluorescencia más brillante. El plasmidio codifica para el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina. Utilizado para monitorear la eficiencia de las transfecciones (Anexo 2).

4.5- Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados se describen en la Tabla 2 y los anticuerpos secundarios en la Tabla 3.

Tabla 2: Anticuerpos primarios.

Especificidad	Proveedor	No Catálogo	Especie	Dilución utilizada
Anti β -actina	Santa Cruz Biotechnology	sc-69879	ratón	1/5000
Anti GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724	ratón	1/5000
Anti Vimentina	Santa Cruz Biotechnology	sc-7557	cabra	1/3000
Anti LOX-1	R & D System	AF1798	cabra	1/5000 (WB)
Anti LOX-1	R & D System	AF1798	cabra	1/200 (IF)
Anti MMP9	Santa Cruz Biotechnology	sc-6841	cabra	1/1000
Anti MMP2	Santa Cruz Biotechnology	sc-10736	conejo	1/3000
Anti E-Caderina	Santa Cruz Biotechnology	sc-8426	ratón	1/1000
Anti N-Caderina	Santa Cruz Biotechnology	sc-7939	conejo	1/1000
Anti-Slug	Santa Cruz Biotechnology	sc-166476	ratón	1/1000
Anti VEGF	Roche	Bevacizumab	humano	1/1000

Fuente: elaboración propia.

Tabla 3: Anticuerpos Secundarios.

Especificidad	Proveedor	No Catálogo	Especie	Dilución utilizada
Anti-ratón Alexa Fluor 790	Jackson	715-655-150	burro	1/30 000 (WB)
Anti-ratón Alexa Fluor 680	Jackson	715-625-150	burro	1/30 000 (WB)
Anti-cabra Alexa Fluor 790	Jackson	705-655-147	burro	1/30 000 (WB)
Anti-conejo Alexa Fluor 790	Jackson	711-655-152	burro	1/30 000 (WB)
Anti-conejo Alexa Fluor 680	Jackson	711-625-152	burro	1/30 000 (WB)
Anti-humano Alexa Fluor 790	Jackson	709-655-149	burro	1/5000 (WB)
Anti-cabra FITC	Dako	F0250	conejo	1/400 (IF)
Anti-cabra TRITC	Jackson	705-025-147	burro	1/400 (IF)

Fuente: elaboración propia.

4.6- Criptas colónicas humanas

El trabajo con muestras humanas se realizó en el laboratorio de Microbiología e Inmunología, Centro de Enfermedad de Crohn y Colitis, Facultad de Medicina Miller de la Universidad de Miami, Miami, Florida; bajo la dirección de la Dra. María T. Abreu y el Dr. Joan Burgueño.

La adquisición de muestra de tejido (biopsia) fue aprobada por el Comité Institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Miami. En este trabajo se utilizó una muestra colon proximal, de tejido no inflamado de un paciente del sexo masculino diagnosticado con colitis ulcerosa (ID organoid1, material suplementario)¹⁵³. La muestra de tejido humano se colectó en la solución HypoThermosol (Sigma-Aldrich, H4416) suplementada con 10 μ M de thiazovivin, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina. La muestra de tejido se lavó 2 veces con HBSS y se incubó por 20 min a 25 °C con una solución de 2 mM de EDTA disuelto en HBSS. La muestra se lavó con HBSS y se incubó con 1 mL de Advanced DMEM/F12, 10 μ M de thiazovivin y 0,13 U Würsch de liberasa-

TM (Roche, 345474) por 30 min a 37 °C. La muestra se homogenizó mediante pipeteo vigoroso, se filtró por tamizador celular de 70 µm y la digestión enzimática se neutralizó con 5 mL de Advanced DMEM/F12 con 10 % de SFB. Las células se colectaron por centrifugación a 150 g por 5 min. Las células se resuspendieron en 40 o 60 µL de matrigel (Cultrex) y se sembraron en placas de 24 pozos con 600 µL de medio WRN completo.

4.7- Cultivo y pasaje de organoides de colon

Los organoides de colon se cultivaron embebidos en matrigel y medio WRN completo a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO₂. Los organoides se pasaron una vez cada 7 días, realizando cambio de medio de cultivo cada 2 días. Los organoides se colectaron en HBSS y se centrifugaron a 150 g por 5 min y 25 °C. La fragmentación y disgregación de los organoides se realizó con TrypLE Express (Gibco, 12605010) suplementado con 10 µM de thiazovivin a 37 °C durante 7 min. Los organoides se sembraron en 10 µL de matrigel (Cultrex).

4.8- Obtención y oxidación de lipoproteínas de baja densidad

Las lipoproteínas de baja densidad se obtuvieron a partir de la sangre periférica de donantes voluntarios normolipémicos. La sangre se colectó mediante venopunción en presencia de 1 mg/mL de EDTA como anticoagulante. El plasma se colectó por centrifugación a 2200 g, 10 min a 25 °C y se trasvasó a tubos de ultracentrífuga (FisherScientific, 03141). La fracción correspondiente a la LDL se colectó mediante ultracentrifugación secuencial a 38 000 g por 20 h a 15 °C con

ajuste de densidad a 1,063 g/mL con KBr. La LDL purificada se dializó 48 h en tampón fosfato-salino (PBS; 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de KH₂PO₄, pH 7,4). La concentración de proteínas se ajustó a 1 mg/mL y la LDL se oxidó con 25 mM de CuSO₄ por 3.5 h a 37 °C. La oxidación de la LDL se monitoreó espectrofotométricamente mediante la formación de dienos conjugados a $\lambda=432$ nm en el equipo Synergy/HTX multi-mode reader (Biotek, EE. UU.). La reacción de oxidación se detuvo con 4,5 μ M de BHT (Sigma, W218405) y 2 mM de EDTA. La LDL oxidada se dializó 24 h contra PBS, se filtró por 0,45 μ m y se almacenó a 4 °C.

4.9- Análisis de la oxidación de la LDL: movilidad electroforética y concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

4.9.1- Movilidad electroforética relativa de LDL oxidada

Se resuspendieron 100 μ g de LDLox y LDL (sin oxidar) en tampón de carga de proteínas en condiciones no reductoras (63 mM de Tris-HCl, 10 % (v/v) de glicerol, 2 % (p/v) de SDS, 0,005 % (p/v) de bromofenol azul, pH 6,8). Estas muestras se aplicaron en un gel de agarosa al 1 % (p/v) (Lonza, 50004) y se hicieron migrar bajo la acción de un campo eléctrico de 80V en tampón barbital (50 mM de barbital de sodio, pH 8,6). Las bandas de proteína se detectaron con solución de tinción (0,05 % (p/v) de azul de Coomassie, 25 % (v/v) de metanol, 10 % (v/v) de ácido acético) y subsiguientes lavados con solución decolorante (5 % (v/v) de metanol, 10 % (v/v) de ácido acético). La imagen del gel se adquirió

con el equipo Odyssey CLx (LI-COR, EE. UU.) a $\lambda=790$ nm. El cambio de la migración electroforética de la LDLox se determinó comparando con la migración electroforética de la LDL.

4.9.2- Ensayo de formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

El grado de lipoperoxidación de la LDLox se analizó mediante la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Se prepararon mezclas con 100 μg de LDLox o LDL, 100 μM de FeSO_4 , 150 μM de ácido ascórbico y 15 mM de Tris-HCl, pH 7,1 en un volumen final de 1 mL y se incubaron a 37 °C por 15 min. Posteriormente, se añadió 1 mL de ácido tricloroacético al 10 %, 2 mL de ácido tiobarbitúrico al 0,375 % y se incubaron por 15 min a 100 °C. Las muestras se centrifugaron 10 min a 1600 g a 25 °C y se analizaron por espectrofotometría a $\lambda=532$ nm. El resultado del ensayo se expresó como nmoles de malondialdehído (MDA)/mg de proteína, utilizando el coeficiente de extinción del complejo MDA-TBA ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.10- Transformación de células quimiocompetentes

Las células quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* Top10 se mezclaron con 50-100 ng de ADN plasmídico. La mezcla se incubó 30 min en hielo, 90 s a 42 °C y 1 min en hielo. Se añadió 1 mL de medio LB líquido (Liofilchem, 610084) y se incubó 1 h a 37 °C. Las células se sembraron en medio LB sólido (Mo Bio Laboratories, 12107-1) suplementado con los antibióticos apropiados. Todos los

plasmidios utilizados en este trabajo confieren resistencia a ampicilina, excepto el plasmidio pEGFP-C2 que confiere resistencia a kanamicina.

4.11- Crecimiento de cultivos bacterianos

Las colonias de las bacterias transformadas con los diferentes plasmidios o con el producto de la reacción de ligamiento (ver 5.18) se inocularon en tubos de 5 mL de medio LB líquido. Los cultivos se suplementaron con 100 µg/mL de ampicilina (US Biological, A2260) para los plasmidios pLP1, pLP2, pLP-VSVG, pLKO.1 y pLKO-shOLR1, o con 50 µg/mL de kanamicina (Duchefa Biochemie, K0126.0010) para el plasmidio pEGFP-C2. Se incubaron a 37 °C por 16 h en agitación a 250 r.p.m. (Agitador SI-300, Lab Companion, Corea). Posteriormente, se inocularon frascos de 500 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico apropiado. Los cultivos bacterianos se crecieron a 37 °C por 16 h en agitación a 250 r.p.m.

4.12- Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (miniprep)

La purificación de ADN se realizó por un método de lisis alcalina a partir de cultivos bacterianos de 5 mL. Las células se precipitaron por centrifugación a 4700 g por 3 min a 25 °C y se resuspendieron en una solución de 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, 100 µg/mL de ribonucleasa A (Invitrogen, 12091-021), pH 7,5. Las células se lisaron con una solución de 0,2 M de NaOH y 1 % de SDS, incubando 5 min a 25 °C. El medio se neutralizó con 1,32 M de KAc, pH 4,8. El lisado celular se centrifugó 15 min a 14 000 g y 25 °C; el sobrenadante fue

transferido a tubos limpios, repitiéndose este último paso de centrifugación. El ADN se precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol centrifugando en las mismas condiciones anteriores. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70 %. Se resuspendió el ADN en 50 μ L de H₂O calidad biología molecular y se cuantificó por espectrofotometría a $\lambda=260$ nm.

4.13- Purificación de ADN plasmídico a escala masiva

La purificación de ADN se realizó por un método de lisis alcalina a partir de cultivos bacterianos de 500 mL. Las bacterias se colectaron mediante 10 min de centrifugación a 11 000 g y 4 °C. El precipitado celular se resuspendió en 14 mL de una solución de 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, 100 μ g/mL de ribonucleasa A, pH 7,5. La suspensión celular se trasvasó a tubos de 40 mL y se incubó 5 min en hielo. Las bacterias se lisaron con 14 mL de una solución de 0,2 M de NaOH y 1 % de SDS por 5 min en hielo. El pH del medio se neutralizó con 12 mL de 1,32 M de KAc, pH 4,8 por 5 min en hielo. Las muestras se centrifugaron 15 min a 25 000 g y 4 °C. El sobrenadante se trasvasó a tubos de 80 mL, filtrando con gasa estéril. Se añadieron 22 mL de isopropanol y se incubó 20 min a 25 °C. Los tubos se centrifugaron 10 min a 25 000 g y 4 °C y el ADN se resuspendió en 2 mL de tampón Tris-EDTA (10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, pH 8,0). Se añadieron 2 mL de 5 M de LiCl y se incubó 10 min en hielo. Las muestras se centrifugaron 10 min a 25 000 g y 25 °C y el sobrenadante se trasvasó a tubos de 40 mL. Se adicionaron 10 mL de etanol absoluto frío, se incubó 20 min a -20

°C y se centrifugó 10 min a 25 000 g y 4 °C. El precipitado se lavó con 10 mL de etanol al 70 % centrifugando 10 min a 25 000 g y 4 °C. El ADN se resuspendió en 1 mL de agua calidad biología molecular y se trasvasó a tubos de 1,5 mL. La concentración de ADN se determinó mediante espectrofotometría a $\lambda=260$ nm.

4.14- Digestiones de ADN plasmídico con endonucleasas de restricción

Los ADN plasmídicos se digirieron con 3 U de enzima por μg de ADN diluido en el tampón apropiado y en un volumen total de 20 y 100 μL para las digestiones analíticas y preparativas, respectivamente. La digestión preparativa del plasmidio pLKO.1 se realizó con las enzimas *AgeI* (New England Biolabs, R0552S) y *EcoRI* (New England Biolabs, R0101S). Las digestiones analíticas se realizaron con la enzima *XhoI* (New England Biolabs, R0146S). Las digestiones se incubaron 1 h a 37 °C. Los productos de las digestiones enzimáticas se mezclaron con tampón de carga para ácidos nucleicos (0,25 % (p/v) de bromofenol azul, 30 % (v/v) de glicerol) y se aplicaron en geles de agarosa al 0,8 % (p/v). La corrida electroforética se realizó con un voltaje constante de 100V en tampón Tris-acetato (TAE; 40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA, pH 8,6)

Los fragmentos de la digestión preparativa se separaron en gel de agarosa de bajo punto de fusión, realizándose la corrida electroforética a 80V en tampón TAE. El fragmento correspondiente al vector pLKO.1 se purificó utilizando el kit de extracción de gel GeneJet (ThermoFisher Scientific, K0691).

Los productos de la digestión analítica se separaron en gel de poliacrilamida al 8 % en condiciones no desnaturizantes. La corrida electroforética se realizó con un voltaje constante de 100V en tampón Tris-borato (5 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,0).

Los productos de las digestiones se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta.

4.15- Desfosforilación de extremo 5´ del vector pLKO.1 digerido con las enzimas *Agel/EcoRI*

La desfosforilación de los extremos 5´ del vector pLKO.1 digerido con las enzimas de restricción *Agel/EcoRI* se realizó con la enzima fosfatasa antártica (New England Biolabs, M0289). Se mezclaron 1 pmol de extremos libres de ADN, 10 U de la enzima y tampón de la enzima (New England Biolabs, B0289S) en un volumen final de 20 µL y se incubó 30 min a 37 °C. La enzima se inactivó a 80 °C durante 20 min.

4.16- Ensamblaje de secuencia codificante para shOLR1

La secuencia codificante para un shARN específico contra el receptor LOX-1 (shOLR1) se ensambló a partir de los siguientes partidores complementarios.

shARN/OLR1 sentido:

5´...CCGGGCTCGGAAGCTGAATGAGAACTCGAGTTTCTCATTTCAGCTTC
CGAGCTTTTTG ...3´

shARN/OLR1 antisentido:

5'...AATTCAAAAAGCTCGGAAGCTGAATGAGAAACTCGAGTTTCTCATTCA
GCTTCCGAGC ...3'

La hibridación se realizó mezclando cantidades equimolares de ambos partidores (100 pmoles) en tampón NEB2 (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7,9) y un volumen final de 50 µL. La mezcla se incubó en termociclador (Tprofessional Basic Gradient 96, Biometra, Alemania) con las condiciones de hibridación descritas en la Tabla 4:

Tabla 4: Condiciones de hibridación.

Paso	Temperatura	Tiempo, número de ciclos
1	95°C	10 min
2	95°C - 85.1°C (disminución 0,3°C/ciclo)	30 s/ciclo, 33 ciclos
3	85°C	2 min
4	85°C - 75.1°C (disminución 0,3°C/ciclo)	30 s/ciclo, 33 ciclos
5	75°C	2 min
6	75°C - 65.1°C (disminución 0,3°C/ciclo)	30 s/ciclo, 33 ciclos
7	65°C	2 min
8	65°C - 55.1°C (disminución 0,3°C/ciclo)	30 s/ciclo, 33 ciclos
9	55°C	2 min
10	55°C - 45.1°C (disminución 0,3°C/ciclo)	30 s/ciclo, 33 ciclos
11	45°C	2 min
12	45°C - 24.9°C (disminución 0,3°C/ciclo)	30 s/ciclo, 66 ciclos

Fuente: elaboración propia

4.17- Fosforilación de extremos 5' del fragmento de ADN shOLR1

La fosforilación de los extremos 5' del fragmento de ADN codificante para shOLR1 se realizó utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa-PNK (New England Biolabs, M0201S). Se mezclaron 2 pmoles de ADN, 10 U de la enzima

PNK y tampón de la enzima (New England Biolabs, B0202S) en un volumen final de 10 μ L y se incubó 30 min a 37 °C. La enzima se inactivó a 65 °C durante 20 min.

4.18- Reacción de ligamiento

Se tomaron 100 ng del vector plasmídico pLKO.1 digerido con las enzimas *AgeI* - *EcoRI* y se mezclaron con una cantidad de inserto adecuada para obtener una relación molar inserto: vector de 3:1. Se añadió 1 U Weiss de la enzima ADN ligasa (New England Biolabs, M0202S) y tampón de la enzima (New England Biolabs, B0202S) en un volumen final de 20 μ L y se incubó 14 h a 16 °C.

4.19- Electroporación del producto de la reacción de ligamiento y obtención de colonias recombinantes

La mitad del producto de la reacción de ligamiento (10 μ L, equivalente a 50 ng de vector) se dializó en membrana de microdiálisis (Merck, VSWP 02500) contra agua destilada por 30 min a 25 °C. El ADN se mezcló con 50 μ L de bacterias electrocompetentes y se transfirió a cubetas de electroporación. Las cubetas se incubaron 5 min en hielo y las bacterias se transformaron aplicando un pulso eléctrico de 1.8 kV en electroporador (MicroPulser, Biorad, EE. UU.). Las cubetas se incubaron 1 min en hielo y se recuperaron las células con 1 mL de medio LB líquido. Las bacterias se incubaron 1 h a 37 °C en agitación a 250 r.p.m. Las células se sembraron en medio LB sólido suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y se crecieron 16 h a 37 °C.

4.20- Obtención de vectores lentivirales

Los vectores lentivirales se obtuvieron mediante transfección de las células HEK293FT con los plasmidios pLP1, pLP2, pLP-VSVG y pLKO-shOLR1. Las células HEK293FT se cultivaron en placas de 100 mm por 48 h. Las células se transfectaron con una mezcla de las siguientes cantidades de plasmidios: 6 µg de pLP1, 6 µg de pLP2, 6 µg de pLP-VSVG y 12 µg de pLKO-shOLR1 utilizando lipofectamina 2000 (ThermoFisher Scientific, 11668027) en medio Opti-MEM (Gibco, 31985-070). Los vectores lentivirales se cosecharon en el medio de cultivo a las 72 h. El sobrenadante del cultivo se centrifugó 10 min a 1600 g, se filtró por 0,45 µm y se almacenó a 4 °C hasta su utilización para transducir las líneas celulares de CCR.

4.21- Determinación de dosis de puromicina mediante curvas de letalidad

Las células COLO320 y HCT116 se sembraron en placas de 24 pozos a 1×10^4 células/pozo y se crecieron 24 h. El medio de cultivo se reemplazó con 1 mL de medio de cultivo con concentraciones crecientes de puromicina (0, 0,2, 0,5, 0,7, 1, 2, 4, 5, 7 y 10 µg/mL). Las células se mantuvieron en cultivo por 10 días. El medio de cultivo se reemplazó cada 2 o 3 días con las diferentes concentraciones de puromicina. La toxicidad de cada condición se determinó mediante ensayo de reducción de metil-thiazolil-difenil-tetrazolio (MTT). Se seleccionó la

concentración menor de puromicina que bloqueó completamente la viabilidad de las células (Anexo 3).

4.22- Transducción de células de CCR con vectores lentivirales.

Obtención de clones con expresión disminuida del receptor LOX-1

Las células COLO320 y HCT116 se sembraron en placas de 24 pozos a 1×10^4 células/pozo y se crecieron 24 h. El medio de cultivo se reemplazó con 1 mL del sobrenadante de cultivo con los vectores lentivirales. Las células se incubaron con los vectores lentivirales durante 6 h a 37 °C. El sobrenadante se reemplazó con medio de cultivo suplementado con 0,5 µg/mL o 5 µg/mL de puromicina para las células HCT116 y COLO320, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron en el medio de selección hasta la aparición de colonias resistentes al antibiótico. Las células transducidas se despegaron mediante tratamiento con solución de 0,25 % de tripsina (HyClone, SH30042.01), se contaron en cámara de Neubauer (BGH, 9020-01) utilizando el método de tinción por exclusión con azul de tripán (Merck, 111732) y se sembraron en placas de 96 pocillos a 0,5 células por pozo en medio de selección. Las placas se monitorearon diariamente y se identificaron los pozos en los cuales crecieron colonias de células resistentes a puromicina a partir de una única célula. Se seleccionaron clones de células transducidas para analizar los niveles de expresión del receptor LOX-1 mediante RT-PCR cuantitativo y Western blot.

4.23- Extracción y cuantificación de proteínas totales

Las proteínas totales se obtuvieron a partir de cultivos celulares sembrados en placas de 6 pozos. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/pozo y se crecieron 24 h. Los tratamientos se realizaron en medio suplementado con 2 % de SFB por 48 h. La monocapa celular se lavó con PBS y las proteínas totales se extrajeron con 120 μ L de solución de lisis RIPA (ThermoFisher Scientific, 89901) suplementada con coctel de inhibidores de proteasas (ThermoFisher Scientific, 78430). El lisado celular se incubó 5 min en hielo, se trasvasó a un tubo de 1,5 mL y se centrifugó 15 min a 19 000 g y 4 °C. El sobrenadante se trasvasó a un tubo limpio y se determinó la concentración de proteínas totales por el método del ácido bicinconínico (BCA) a $\lambda = 562$ nm, con el kit de cuantificación de proteínas Pierce™ BCA™ (ThermoFisher Scientific, 23225). Se utilizó una curva de calibración de BSA con un rango de concentraciones de proteínas desde 62,5 a 2000 μ g/mL.

4.24- Electroforesis de geles de poliacrilamida y Western blot

Las muestras de proteínas totales se mezclaron con tampón de carga (de 30 a 50 μ g de proteínas totales) y se desnaturalizaron por 5 min a 95 °C. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 o 12 %. Se aplicaron las muestras y se hicieron migrar bajo la acción de un campo eléctrico de 110V en tampón Tris-glicina (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1 % (p/v) de SDS, pH 8,3; Winkler, BM-0540). La transferencia de las proteínas hacia membranas de

nitrocelulosa (GVS Life Sciences, 1215471) se realizó con el equipo de transferencia semiseco Trans-Blot Turbo (BioRad, EE. UU.) y tampón de transferencia (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 20 % (v/v) de metanol, pH 8,3; Merck, 9000-OP) durante 25 min. La transferencia se verificó tiñendo las membranas con una solución de rojo Ponceau al 0,5 % (p/v).

Las membranas se bloquearon 1 h con 30 mL de leche descremada al 5 % (p/v) disuelta en tampón Tris salino (TBS; 20 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,6) a 25 °C. Las membranas se incubaron 14 h a 4 °C en agitación con los anticuerpos correspondientes (Tabla 2) diluidos en solución de incubación de anticuerpos (2 % (p/v) de leche descremada, 0,1 % (v/v) de Tween 20 disuelto en TBS). Las membranas se lavaron 10 min con solución de lavado (0,1 % (v/v) de Tween 20, 0,01 % (p/v) de SDS disuelto en TBS) y se incubaron 1 h con los anticuerpos secundarios (Tabla 3) a 25 °C en agitación. Los lavados se repitieron y la señal de fluorescencia se reveló con el equipo Odyssey CLx a $\lambda=680$ nm y $\lambda=790$ nm.

4.25- Inmunofluorescencia

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro colocados en placas de 24 pocillos, se fijaron con 4 % de paraformaldehído (PFA) disuelto en PBS por 30 min a 25 °C y se lavaron 3 veces. Posteriormente, se bloquearon con 1 % (p/v) de BSA (Rockland Immunochemicals, BSA-50) en tampón Tris-fosfato (10 mM de Tris-HCl, 120 mM de NaCl, 3,5 mM de KH_2PO_4 , 8,4 mM de

Na₂HPO₄, pH 7,8) durante 1 h a 25 °C. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces y se incubaron 12 h con el anticuerpo primario (Tabla 2) a 4 °C. Se lavaron 3 veces y se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario (Tabla 3) a 25 °C. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje con DAPI / TRITC (Santa Cruz Biotechnology, sc-359850; Vector Laboratories, H-1600-10). Cada muestra se analizó y fotografió con un aumento de 60X en el microscopio de fluorescencia IX81(Olympus, Japón). Todos los lavados se realizaron por 10 min con tampón Tris-fosfato.

4.26- Purificación de ARN total

Las purificaciones de ARN se realizaron a partir de cultivos celulares sembrados en placas de 24 o 12 pozos. La monocapa celular se lavó con PBS y se añadió 1 mL del reactivo trizol (Invitrogen, 15596018). El lisado celular se homogenizó, se trasvasó a tubos de 1,5 mL y se incubó 5 min a 25 °C. Se añadió 0,2 mL de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se incubó 3 min a 25 °C. La mezcla se centrifugó a 14 000 g por 15 min a 4 °C y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio. El ARN total se precipitó con 0,5 mL de isopropanol centrifugando 5 min a 14 000 g a 25 °C y se lavó con etanol al 70 % (v/v). El ARN se resuspendió en 30 o 40 µL de agua calidad biología molecular. La integridad del ARN purificado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) identificando las subunidades de ARN ribosómico. El ARN se cuantificó por espectrofotometría a $\lambda=260$ nm. La pureza del ARN purificado se estimó mediante espectrofotometría

a $\lambda=230$ y $\lambda=280$ nm. Los ARN se diluyeron en agua a $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior utilización.

4.27- Análisis de expresión relativa de ARNm mediante qRT-PCR

La expresión relativa de los genes analizados se determinó utilizando el kit Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix 1-step (Agilent Technologies, 600825). Las reacciones de PCR se realizaron según el protocolo sugerido por el fabricante, utilizando 200 o 400 ng de ARN y 400 nM de partidores por reacción de amplificación. Todos los partidores que se utilizaron y los genes que se analizaron se muestran en la Tabla 5. Las condiciones de las reacciones de retrotranscripción, amplificación y disociación se muestran en la Figura 5. Las reacciones se realizaron en el equipo AriaMx (Agilent Technologies, EE. UU.) y se analizaron con el software AriaMx, versión 1.5 (Agilent Technologies, EE. UU.) por el método del $2^{-\Delta\Delta\text{CT}154}$, utilizando como gen normalizador *ACTB* o *GAPDH*.

4.28- Análisis de expresión del receptor LOX-1 en cáncer de colorrectal utilizando la base de datos Oncomine

La expresión del receptor LOX-1 se analizó en cuatro bases de datos de microarreglos para cáncer de colon (Kaiser, Hong, Skrzypczak y Gaedcke) obtenidas de la base de datos Oncomine¹⁵⁵. En esta base de datos se puede realizar una comparación de los niveles de expresión del ARNm de LOX-1 en los tejidos cancerosos respecto a los niveles presentes en la mucosa colónica normal.

Tabla 5: Secuencia de partidores.

Gen	Secuencia partidores sentido	Secuencia partidores antisentido
ACTB (β -actina)	5' -TGTACCCTGGCATTGCCGACAG-3'	5' -ACGGAGTACTTGCCTCAGGAG-3'
BCL2	5' -TGATGGGATCGTTGCCTTATGC-3'	5' -ACCAATTTCCCTGTGCGAGACTT-3'
BCL2L1 (BCL-x)	5' -GGTGAGTCGGATCGCAGCTT-3'	5' -TGAAGCGTTCCTGGCCCTTT-3'
CDH1 (E-Cadherina)	5' -CCTGGGACTCCACCTACAGA-3'	5' -TGGATTCCAGAAACGGAGGC-3'
CDH2 (N-Cadherina)	5' -CAGTATCCGGTCCGATCTGC-3'	5' -CATATGGTGGAGCTGTGGGG-3'
MMP2	5' -GCCTGAGCTCCCGAAAAGA-3'	5' -GGGTGCTGGCTGAGTAGATCC-3'
MMP7	5' -GGAACAGGCTCAGGACTATCT-3'	5' -TGCATCTCCTTGTAGTTGGCTT-3'
MMP9	5' -TGCTTTGGACACGCACGA-3'	5' -TGGTTCAACTCACTCCGGGAAC-3'
OLR1 (LOX-1)	5' -AAACCCTTGCTCGGAAGCTGAA-3'	5' -TGCGGACAAGGAGCTGAACAAT-3'
SNAI1 (Snail)	5' -CGCGCTCTTTCTCGTCAGG-3'	5' -GTCGTAGGGCTGCTGGAAGG-3'
SNAI2 (Slug)	5' -GACCCCATGCCATTGAAGC-3'	5' -CGCAGTGCAGCTGCTTATGT-3'
TWIST1	5' -GCTACGCCTTCTCGGTCTGG-3'	5' -ACATCTAGGTCTCCGGCCCT-3'
VEGFA	5' -CTGCTTACCTCCACCATGC-3'	5' -AGCTGCGCTGATAGACATCC-3'
VIM (Vimentina)	5' -CCGGGAGAAATTGCAGGAGGAG-3'	5' -AGGTCAAGACGTGCCAGAGAC-3'
ZEB1	5' -GTGTTACCAGGGAGGAGCAGT-3'	5' -AGCTTCAGGCCCCAGGATTT-3'
ZEB2	5' -GCGTTTGC GGAGACTTCA-3'	5' -GCCCTGAGCGTGAGCATCAT-3'

Fuente: elaboración propia

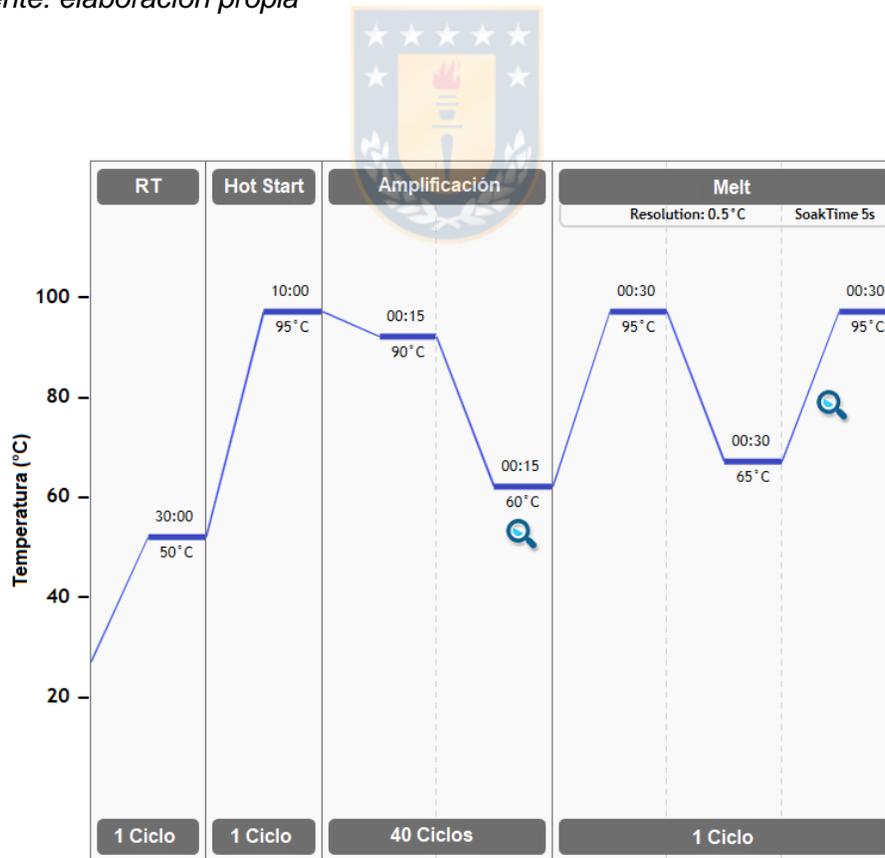


Figura 5: Condiciones de RT-PCR en tiempo real. Perfiles térmicos de reversotranscripción (RT), amplificación y disociación (Melt) empleados en las reacciones de PCR en tiempo real. Fuente: elaboración propia.

4.29- Análisis de los niveles de expresión del receptor LOX-1

Los niveles de expresión del receptor LOX-1 se analizaron mediante Western blot y RT-PCR cuantitativo.

4.30- Tratamientos con TNF y LDL oxidada

Las células de CCR se incubaron con 0; 1; 2,5; 5; 10 y 20 ng/mL de TNF- α (Merck, GF023) y 0; 12,5; 25; 50; 75; 100 y 150 μ g/mL de LDLox en medio con SFB al 2 % por 24 y 48 h para los ensayos de viabilidad celular y de expresión de LOX-1. Los ensayos de cotratamiento se realizaron incubando las células con una concentración de TNF- α fija de 10 ng/mL por 12 h. Posteriormente se trataron las células COLO320 con 25 y/o 50 μ g/mL de LDLox y las células HCT116 con 50 y/o 100 μ g/mL de LDLox por 48 h.

4.31- Ensayos de proliferación celular

4.31.1- Conteo de células por exclusión con azul de tripán

Las células de CCR se sembraron a 2×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos y se crecieron por 24 h a 37 °C. Las células se trataron con 0; 6,5; 12,5; 25 y 50 μ g/mL de LDLox. Las células se incubaron con los tratamientos experimentales por 48, 72 y 96 h. Posteriormente, se desprendieron con solución de tripsina por 5 min a 37 °C. Se realizaron diluciones 1/2 en solución azul de tripán y las células se contaron en cámara de Neubauer.

4.31.2- Ensayo de reducción de bromuro de metil-thiazolil-difenil- tetrazolio.

4.31.2.1- Líneas celulares

Las células de CCR se sembraron a 2×10^4 células/pozo en placas de 96 pocillos y se crecieron por 24 h a 37 °C. Los tratamientos experimentales se realizaron por 24, 48, 72 o 96 h en medio con 2 % de SFB. Se añadieron 10 μ L de 5 mg/mL de MTT (ThermoFisher Scientific, M6494) y se incubó de 2 a 4 h a 37 °C. Los cristales formados de formazán se solubilizaron con 100 μ L de isopropanol ácido (0,01 M de HCl) por 15 min a 37 °C. Se determinó la absorbancia a $\lambda=570$ nm en espectrofotómetro.



4.31.2.2- Organoides

Los organoides se sembraron embebidos en matrigel (Cultrex) en placas de 24 pozos con medio WRN completo y se crecieron por 48 h a 37 °C. Los organoides se incubaron con los distintos tratamientos en medio RENC por 4 días. El medio de cultivo se sustituyó por Advanced DMEM/F12 sin rojo fenol (Gibco, 11039021) conteniendo 1 mg/mL de MTT. Los organoides se incubaron 4 h a 37 °C. Los cristales de formazán se solubilizaron con 100 μ L de SDS al 10 % (p/v) por 1 h a 37 °C. Se determinó la absorbancia a $\lambda=570$ nm en espectrofotómetro.

4.32- Ensayos de migración celular

Los ensayos de migración celular se realizaron con transwells de 8 μ m de diámetro de poro (Corning, 3422). Las células COLO320 y HCT116 se sembraron a 5×10^5 células/pozo en placas de 6 pozos y se crecieron 24 h a 37 °C. Las

células se incubaron por 48 h con las distintas condiciones experimentales. Las células se despegaron, se contaron y se sembraron en la cámara superior del transwell en medio de cultivo sin SFB. Se sembraron 5×10^4 de células COLO320 y 1×10^5 de células HCT116. En la cámara inferior del pozo se añadió medio de cultivo con 10 % de SFB como quimioatrayente y las células se incubaron por 24 h.

Los transwells se colocaron en una placa nueva sin medio de cultivo. Las células de la cámara superior del transwell se removieron con un hisopo de algodón y las células que migraron hacia la cámara inferior se fijaron por 15 min con 4 % (p/v) de PFA. Los transwells se incubaron con una solución de cristal violeta al 0,5 % (p/v) por 30 min a 25 °C. Se eliminó el exceso de colorante con agua destilada y se secaron los transwells. Las membranas se cortaron y montaron sobre portaobjetos para su visualización en el microscopio donde se fotografiaron y se contó el total de células que migraron hacia la zona inferior de los transwells.

4.33- Ensayos de invasión celular

Los ensayos de invasión celular se realizaron de manera similar a los ensayos de trans migración celular con las siguientes 2 diferencias.

1: Los transwells se recubrieron con una delgada capa de 50 μ L de matrigel (Becton-Dickinson, 354234) a una concentración de proteínas de 4 mg/mL. El matrigel se solidificó por 30 min a 37 °C y después se sembraron las células en la cámara superior.

2: Las células sembradas en la cámara superior de los transwells se incubaron por 48 h.

4.34- Ensayos de zimografía para analizar la actividad proteolítica de metaloproteinasas de matriz extracelular

Las células de CCR se sembraron a 5×10^5 células/pozo en placas de 6 pozos y se crecieron por 24 h a 37 °C. Las células se incubaron con las distintas condiciones experimentales en medio de cultivo suplementado con 2 % de SFB por 48 h. Los sobrenadantes se colectaron, se concentraron en rotoevaporador a 25 °C y se cuantificaron por el método del ácido bicinconínico (BCA).

Se prepararon geles al 8 % de poliacrilamida co-polimerizados con 2 mg/mL de gelatina (Sigma, G1890). Las muestras, de 70 a 80 µg de proteínas totales, se mezclaron con tampón de carga en condiciones no reductoras, se aplicaron en los geles y se hicieron migrar bajo la acción de un campo eléctrico de 90V en tampón Tris-glicina. Los geles se lavaron con una solución de 2,5 % (v/v) de tritón X-100 (Sigma, T8787) por 40 min y se incubaron en solución de incubación entre 18 y 24 h a 37 °C (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl 150, 10 mM de CaCl₂, pH 8,0). Las bandas, producto de la degradación enzimática de la gelatina por las metaloproteinasas, se detectaron con solución de tinción y subsiguientes lavados con solución decolorante. Se capturaron las imágenes con el equipo Odyssey CLx a $\lambda=790$ nm y las señales se cuantificaron con el programa ImageJ.

4.35- Análisis del efecto de la LDL oxidada en el crecimiento de organoides de colon humanos

Los organoides se sembraron embebidos en matrigel en placas de 24 pozos con medio WRN completo y se crecieron 48 h a 37 °C. Posteriormente, se incubaron con 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 100 y 150 µg/mL de LDLox en medio RENC por 4 días, reemplazando parcialmente el medio de cultivo a las 48 h. Se adquirieron fotografías solapadas para abarcar completamente el área de la gota de matrigel. Las fotografías se ensamblaron con el programa ImageJ. El área de todos los organoides presentes en la gota de matrigel se calculó con el programa ImageJ (Anexo 5). La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT (ver 5.31.3.2).

4.35.1- Análisis del efecto de la inhibición de especies reactivas del oxígeno en el crecimiento de organoides de colon humanos estimulados con LDL oxidada

Los organoides se sembraron embebidos en matrigel en placas de 24 pozos con medio WRN completo y se crecieron 48 h a 37 °C. Posteriormente, se incubaron con 80 µg/mL de LDLox en medio RENC por 4 días en presencia o ausencia de 10 µM de VAS2870 (Sigma, SML0273), 0,25 µM de ML 171 (Cayman Chemical, CAY-19056) o 2,5 mM de N-acetil cisteína (Sigma, A9165), reemplazando parcialmente el medio de cultivo a las 48 h. Se adquirieron fotografías solapadas para abarcar completamente el área de la gota de matrigel. Las fotografías se

ensamblaron con el programa ImageJ v1.53c. El área de todos los organoides presentes en la gota de matrigel se calculó con el programa ImageJ v1.53c. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT (ver 5.31.3.2).

4.36- Análisis estadístico de datos

Los datos se analizaron y graficaron con el programa Graphpad Prism, versión 7.0. La distribución normal de los datos se analizó con la prueba de Shapiro–Wilk o la prueba de Kolmogorov–Smirnov y la homogeneidad de varianza con la prueba F o la prueba de Brown–Forsythe.

Las comparaciones entre 2 grupos se realizaron con la prueba T de datos no pareados y la corrección de Welch para datos sin homocedasticidad. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante ANOVA de una vía. Las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (ANOVA paramétrico) o la prueba de Dunn (ANOVA no paramétrico). Las diferencias respecto al grupo control se determinaron con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (ANOVA paramétrico) o la prueba de Dunn (ANOVA no paramétrico). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Cada experimento fue repetido al menos tres veces. Los resultados se representan como la media \pm desviación estándar.

5. RESULTADOS

5.1- Análisis de la expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares y en muestras clínicas de cáncer colorrectal

5.1.1- Expresión de ARNm de LOX-1 en muestras clínicas de carcinoma y adenocarcinoma colorrectal

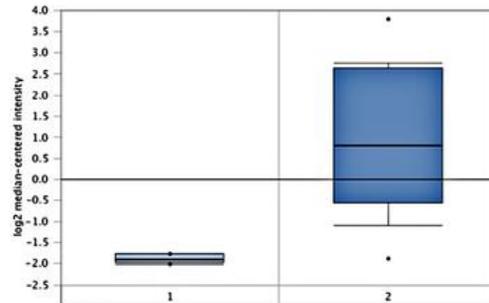
Para investigar si la expresión de LOX-1 está aumentada en muestras clínicas de CCR realizamos un análisis de datos de microarreglos de ARNm de la base de datos Oncomine¹⁵⁵. Se identificaron 4 estudios depositados en esta base de datos en los cuales los niveles de ARNm de LOX-1 están aumentados en comparación con el tejido colónico normal localizado entre 3 y 10 cm adyacente a los tumores^{156,157} o respecto a la mucosa normal de individuos sanos^{158,159} (Figura 6).

Los niveles de expresión del ARNm del receptor LOX-1 están aumentados 6,404 y 3,148 veces en el estudio realizado por Kaiser y cols.¹⁵⁷ (adenocarcinoma mucinoso y adenocarcinoma, respectivamente), 2,259 veces en el estudio de Hong y cols.¹⁵⁸ (carcinoma), 1,901 veces en el estudio de Skrzypczak y cols.¹⁵⁹ (carcinoma) y 1,815 veces en el estudio de Gaedcke y cols.¹⁵⁶ (adenocarcinoma); en comparación con los niveles detectados en el tejido normal. En todos los estudios el aumento de la expresión de LOX-1 en el tejido tumoral fue significativo.

OLR1 Expression in Kaiser Colon
Colon Mucinous Adenocarcinoma vs. Normal

Kaiser Colon Statistics

Over-expression Gene Rank: 1803 (in top 10%) P-value: 5.91E-5
Reporter: 210004_at t-Test: 5.553
Fold Change: 6.404

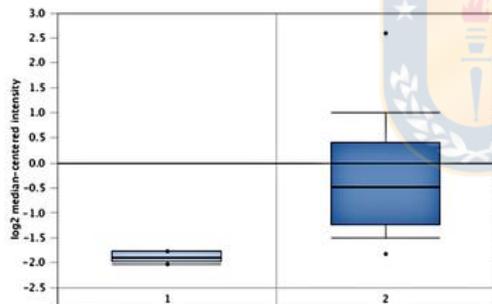


Legend
1. Colon (5)
2. Colon Mucinous Adenocarcinoma (13)

OLR1 Expression in Kaiser Colon
Colon Adenocarcinoma vs. Normal

Kaiser Colon Statistics

Over-expression Gene Rank: 226 (in top 2%) P-value: 1.31E-11
Reporter: 210004_at t-Test: 8.885
Fold Change: 3.148

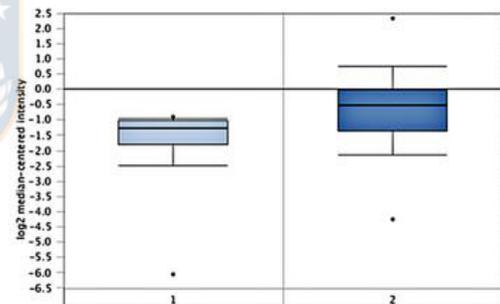


Legend
1. Colon (5)
2. Colon Adenocarcinoma (41)

OLR1 Expression in Hong Colorectal
Colorectal Carcinoma vs. Normal

Hong Colorectal Statistics

Over-expression Gene Rank: 6458 (in top 33%) P-value: 0.008
Reporter: 210004_at t-Test: 2.715
Fold Change: 2.259

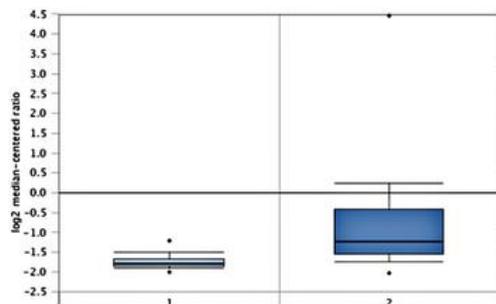


Legend
1. Colon (12)
2. Colorectal Carcinoma (70)

OLR1 Expression in Gaedcke Colorectal
Rectal Adenocarcinoma vs. Normal

Gaedcke Colorectal Statistics

Over-expression Gene Rank: 3577 (in top 19%) P-value: 5.28E-9
Reporter: A_24_P124624 t-Test: 6.530
Fold Change: 1.815

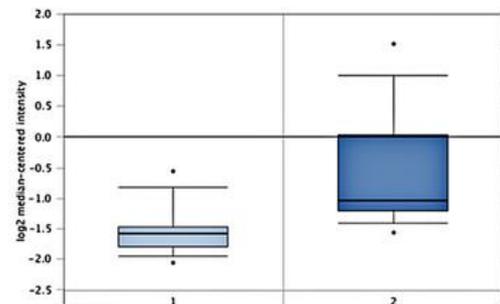


Legend
1. Rectum (65)
2. Rectal Adenocarcinoma (65)

OLR1 Expression in Skrzypczak Colorectal
Colorectal Carcinoma vs. Normal

Skrzypczak Colorectal Statistics

Over-expression Gene Rank: 1248 (in top 7%) P-value: 3.98E-7
Reporter: 210004_at t-Test: 5.624
Fold Change: 1.901



Legend
1. Colorectal Tissue (24)
2. Colorectal Carcinoma (36)

Figura 6: Expresión del receptor LOX-1 en muestras clínicas de cáncer colorrectal. Los niveles de expresión de ARNm de LOX-1 en muestras de cáncer colorrectal (2/azul oscuro) se compararon con los niveles de expresión en tejidos normales de colon o recto (1/azul claro). Los datos de cada panel corresponden a un mismo estudio. En paréntesis se indica el número de muestras de pacientes que se analizaron en cada estudio. *Overexpression gene Rank*: Rango en el cual se encuentra el gen *OLR1* entre todos los genes sobreexpresados. *P-value*: valor de p. *T-test*: valor del estadístico t. *Fold change*: cambio de expresión respecto al control. Los gráficos están organizados por el cambio en el nivel de expresión. *Fuente: modificado de la base de datos Oncomine.*

5.1.2- Expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares de cáncer colorrectal

La expresión del receptor LOX-1 se analizó en las líneas celulares de cáncer colorrectal COLO320 y HCT116 por Inmunofluorescencia y Western blot (Figura 7). Se identificó la presencia de señal inmunofluorescente en las células incubadas con un anticuerpo específico para LOX-1 (Figura 7A) y la expresión del receptor se confirmó mediante Western blot (Figura 7B). Los niveles de expresión de proteína en las líneas celulares de CCR se compararon respecto a la línea celular de cáncer de próstata DU-145, que se conoce que expresan este receptor⁶⁶. Los niveles de expresión de LOX-1 detectados fueron similares en las muestras provenientes de las tres líneas celulares (Figura 7B).

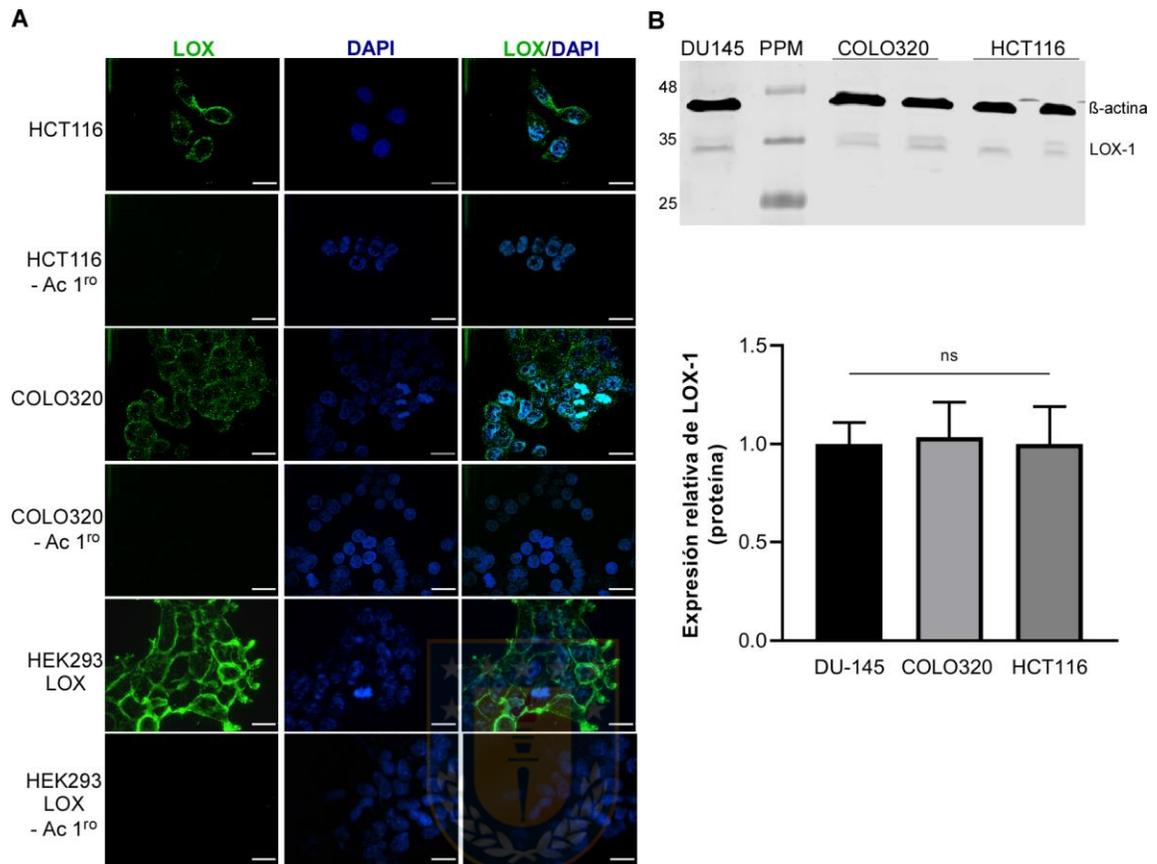


Figura 7: Expresión del receptor LOX-1 en líneas celulares de cáncer colorrectal. La expresión basal del receptor LOX-1 se determinó mediante inmunofluorescencia (A) y Western blot (B) en las líneas celulares de CCR COLO320 y HCT116. **A)** El receptor LOX-1 se detectó con un anticuerpo policlonal anti-LOX-1 y un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado a FITC (verde). Los núcleos celulares se detectaron con el reactivo de tinción nuclear DAPI (azul). Microfotografía captada con microscopio de fluorescencia, aumento 60x, escala: 20 μ m. HEK293-LOX: células que sobreexpresan el receptor LOX-1. **B)** Cuantificación de los niveles de expresión relativos del receptor LOX-1 en las células COLO320 y HCT116, respecto a las células de cáncer de próstata DU-145. La expresión de la proteína β -actina se utilizó como normalizador de carga. La gráfica representa la media \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey. PPM: Patrón de peso molecular. *Fuente: elaboración propia.*

5.2- Obtención de vectores lentivirales codificantes para un shARN específico para el gen *OLR1*

5.2.1- Clonamiento de secuencia codificante para un shARN contra el receptor LOX-1 en el vector de transferencia lentiviral pLKO.1

Se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios cuya secuencia empalmada codifica para un shARN específico contra el receptor LOX-1 (Figura 8). Los extremos 5' se fosforilaron con la enzima T4 polinucleótido quinasa y el fragmento de ADN resultante de 62 pb se clonó en el vector pLKO.1 digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *AgeI*, obteniéndose como resultado el plasmidio pLKO-shOLR1 (Figura 9A).

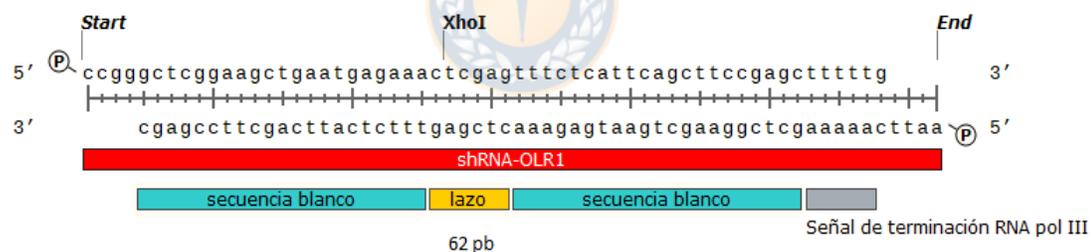


Figura 8: Secuencia nucleotídica y representación esquemática del shARN específico contra el receptor LOX-1. Los extremos 5' y 3' son compatibles con los extremos generados por las enzimas de restricción *EcoRI* y *AgeI*, respectivamente. Secuencia blanco: secuencia de 21 pb específica contra el receptor LOX-1. Fuente: elaboración propia.

Se seleccionaron 12 colonias a partir de las cuales se purificó ADN plasmídico y la inserción de la secuencia codificante para el shOLR1 en el plasmidio pLKO.1 se comprobó mediante digestión enzimática. La incorporación del shARN en el plasmidio introduce un nuevo sitio *XhoI* que genera un fragmento de ADN de 43

pb (Figura 9B). La incorporación de la secuencia de ADN codificante para el shOLR1 se corroboró mediante secuenciación automática (Figura 10).

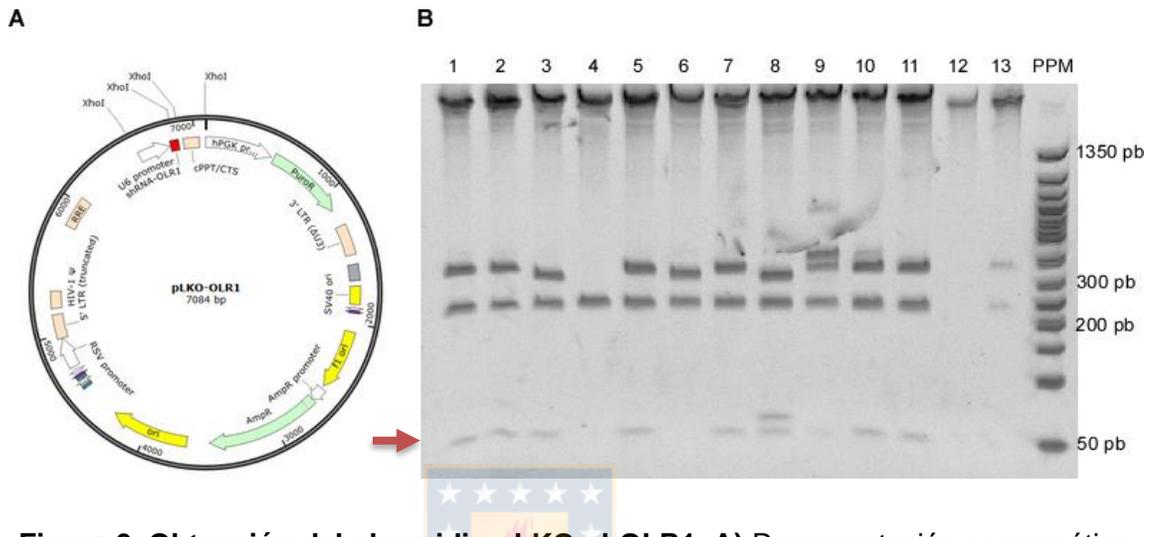


Figura 9: Obtención del plasmidio pLKO-shOLR1. **A)** Representación esquemática del plasmidio de transferencia lentiviral pLKO-shOLR1. **B)** Análisis de restricción de clones digeridos con la enzima *XhoI* resueltos en PAGE al 7 %. La inserción del shARN contra LOX-1 en el vector pLKO.1 introduce un nuevo sitio *XhoI*. Carriles 1-12: Clones analizados producto de la reacción de ligamiento digeridos con *XhoI* (bandas esperadas de 43, 190, 295 y 6556 pb); Carril 13: pLKO.1 digerido con *XhoI* (bandas esperadas: 190, 304 y 6556 pb). PPM: Patrón de peso molecular de 50 pb de NEB (N3236S). y 372 pb). La flecha roja indica la banda que se genera al digerir con la enzima *XhoI* debido a la inserción del shOLR1 en el vector. *Fuente: elaboración propia.*

5.2.2- Análisis funcional del vector pLKO-shOLR1

La funcionabilidad del shARN específico contra LOX-1 clonado en el plasmidio pLKO-shOLR1 se evaluó en la línea celular HEK293-LOX que sobreexpresa constitutivamente el receptor LOX-1. El plasmidio pLKO-shOLR1 se transfectó en las células HEK293-LOX y los niveles de expresión del receptor LOX-1 se evaluaron mediante RT-PCR cuantitativo, Western blot e inmunofluorescencia (Figura 11).

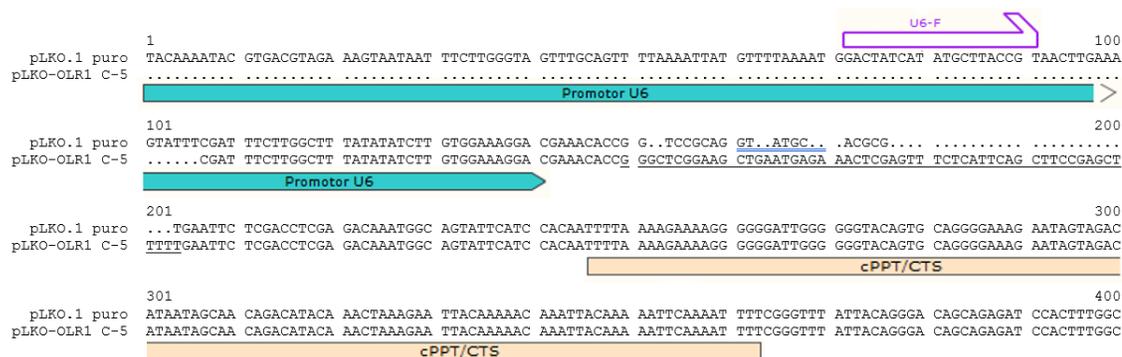


Figura 10: Secuenciación del plasmidio pLKO-shOLR1 y alineamiento con el plasmidio parental pLKO.1. El plasmidio de transferencia lentiviral pLKO-shOLR1 se secuenció utilizando el partidor U6-F. El resultado de la secuenciación automática se alineó con el plasmidio parental pLKO.1 utilizando el programa VectorNTI versión 7.1. La secuencia correspondiente a shOLR1 se representa subrayada. Las secuencias correspondientes al promotor U6 y a la región central de polipurinas/terminación (cPPT/CTS) se representa con colores azul y naranja, respectivamente. *Fuente: elaboración propia.*

Se demostró que el shOLR1 disminuyó la expresión del receptor LOX-1 en un 64 % respecto a los niveles de expresión de las células HEK293-LOX mediante PCR en tiempo real (Figura 11A) y en un 57 % mediante Western blot (Figura 11B). Además, mediante inmunofluorescencia se detectaron células con una expresión reducida del receptor LOX-1 (Figura 11C). Estos experimentos indicaron que el shARN específico contra LOX-1 codificado en el plasmidio pLKO-shOLR1 es funcional y que redujo significativamente la expresión del receptor LOX-1 en la línea celular HEK293-LOX. Con este plasmidio se generaron vectores de transducción lentiviral en la línea celular HEK293FT para obtener líneas celulares que expresen constitutivamente el shOLR1 específico contra el receptor LOX-1.

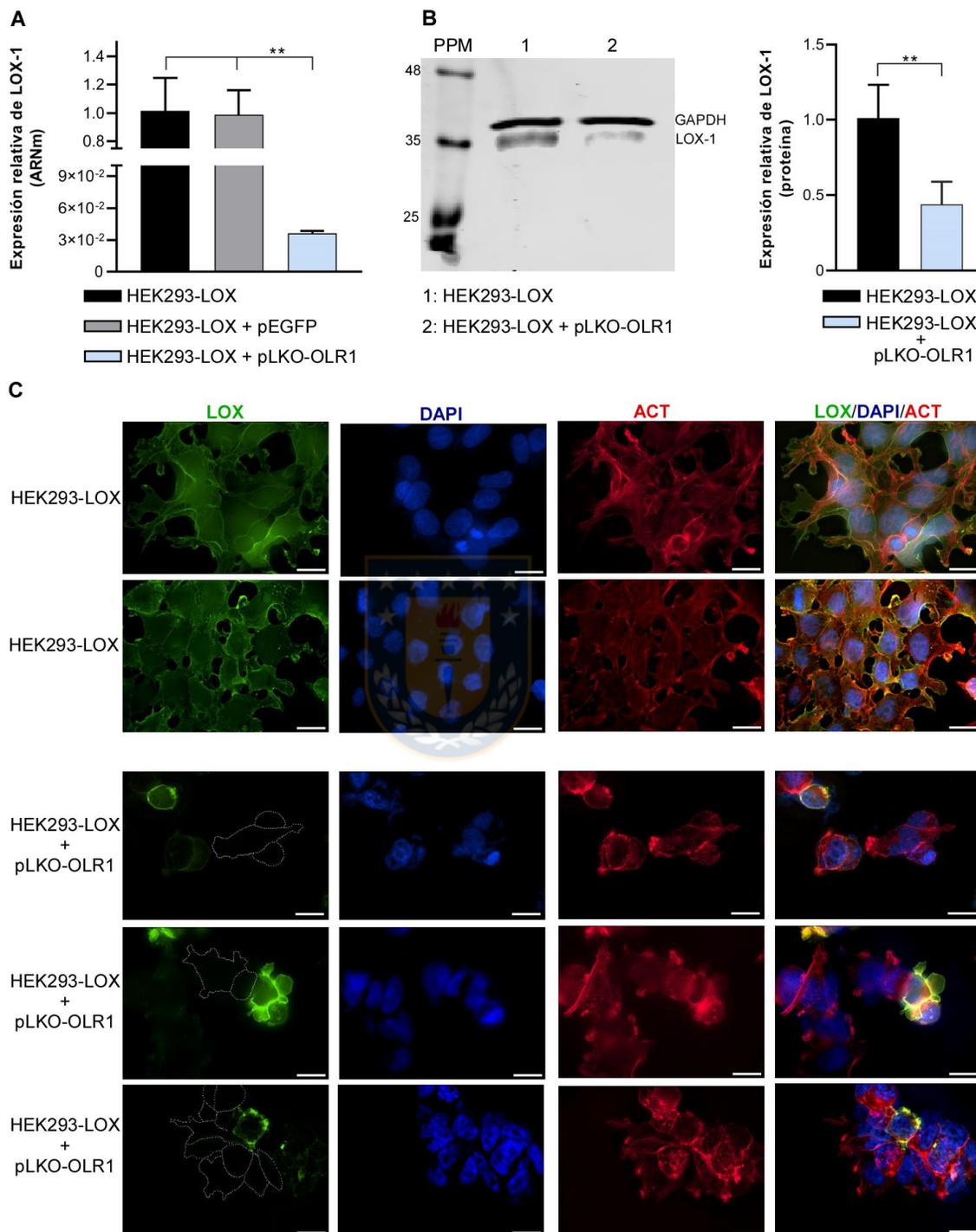


Figura 11: Expresión del receptor LOX-1 en células HEK293-LOX-1(+) transfectadas con el plasmidio pLKO-shOLR1. A) Niveles de expresión relativa del ARNm del receptor LOX-1 en células HEK293-LOX transfectadas con el plasmidio pLKO-shOLR1: HEK293-LOX + pLKO-OLR1; con el plasmidio codificante para la GFP pEGFP-C2: HEK293-LOX + pEGFP o sin transfectar: HEK293-LOX. Cada condición se ensayó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, ** $p < 0,01$. **B)** Niveles de expresión relativa del receptor LOX-1, cuantificado por Western blot, en células HEK293-LOX y células HEK293-LOX transfectadas con el plasmidio pLKO-OLR1. La expresión de la proteína GAPDH se utilizó como control de carga. La gráfica representa la media \pm SD, n=3. Prueba t-student, ** $p < 0,01$. **C)** Inmunofluorescencia. El receptor LOX-1 se detectó con un anticuerpo policlonal anti-LOX-1 y un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado a FITC (verde). Los filamentos de actina se detectaron con faloidina conjugada a TRITC (rojo) y los núcleos celulares se detectaron con el reactivo de tinción nuclear DAPI (azul). Panel superior: células HEK293-LOX no transfectadas. Panel inferior: células HEK293-LOX transfectadas con el plasmidio pLKO-OLR1, se delinearon los contornos de las células con expresión disminuida del receptor LOX-1. Microfotografía captada con microscopio de fluorescencia, aumento 60x, escala: 20 μ m. Fuente: elaboración propia.

5.2.3- Obtención de líneas celulares de cáncer colorrectal con expresión disminuida del receptor LOX-1 mediante transducción con vectores lentivirales

Las líneas celulares COLO320 y HCT116 se transdujeron con el vector lentiviral codificante para shOLR1 y se seleccionaron colonias resistentes a puromicina. Para cada línea celular se seleccionó un clon con reducción significativa del ARNm del receptor LOX-1 (Figura 12). La disminución de los niveles de ARNm del receptor LOX-1 fue de un 60 % en las células HCT-LOX(-) y de un 48 % en las células COLO-LOX(-). Las células seleccionadas no mostraron cambios aparentes en la morfología ni en el crecimiento en comparación con las líneas parentales (Anexo 4).

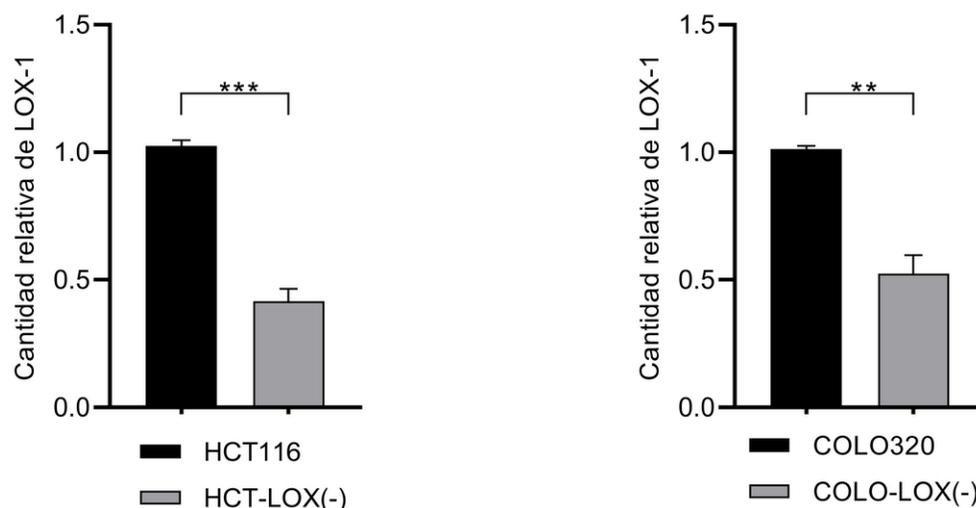


Figura 12: Expresión del receptor LOX-1 en células de CCR transducidas con vector lentiviral codificante para shOLR1. Niveles de expresión relativa del ARNm del receptor LOX-1 en células transducidas COLO-LOX(-) y HCT-LOX(-) en comparación con las líneas parentales. Cada condición se ensayó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. HCT116: prueba t-student; COLO320: prueba t-student con corrección de Welch, ** p<0,01; *** p<0,001. Fuente: elaboración propia.

5.3- Obtención y oxidación de LDL

La LDL se obtuvo desde el suero de personas sanas normolipémicas y se oxidó durante 3,5 h con CuSO_4 a 10 μM . La cinética de oxidación de 4 purificaciones se determinó espectrofotométricamente por la formación de dienos conjugados (Figura 13A). Para cada reacción de oxidación se determinaron los parámetros cinéticos utilizando la primera y segunda derivada (Figura 13B, C y D). La LDLox obtenida posee una movilidad electroforética relativa (Mr) mayor comparada con la LDL, con una Mr de 0.6 para LDLox vs Mr de 0,522 para LDL (Figura 13E).

Los procesos de lipoperoxidación lipídica generan aldehídos reactivos, ej. malondialdehído (MDA), como productos finales de oxidación que reaccionan con

el ácido tiobarbitúrico. La LDLox que se obtuvo tiene una mayor concentración de MDA que la LDL (promedio de 83,33 nmol MDA/mg de proteína vs 40,38 nmol MDA/mg de proteína) (Figura 13F).

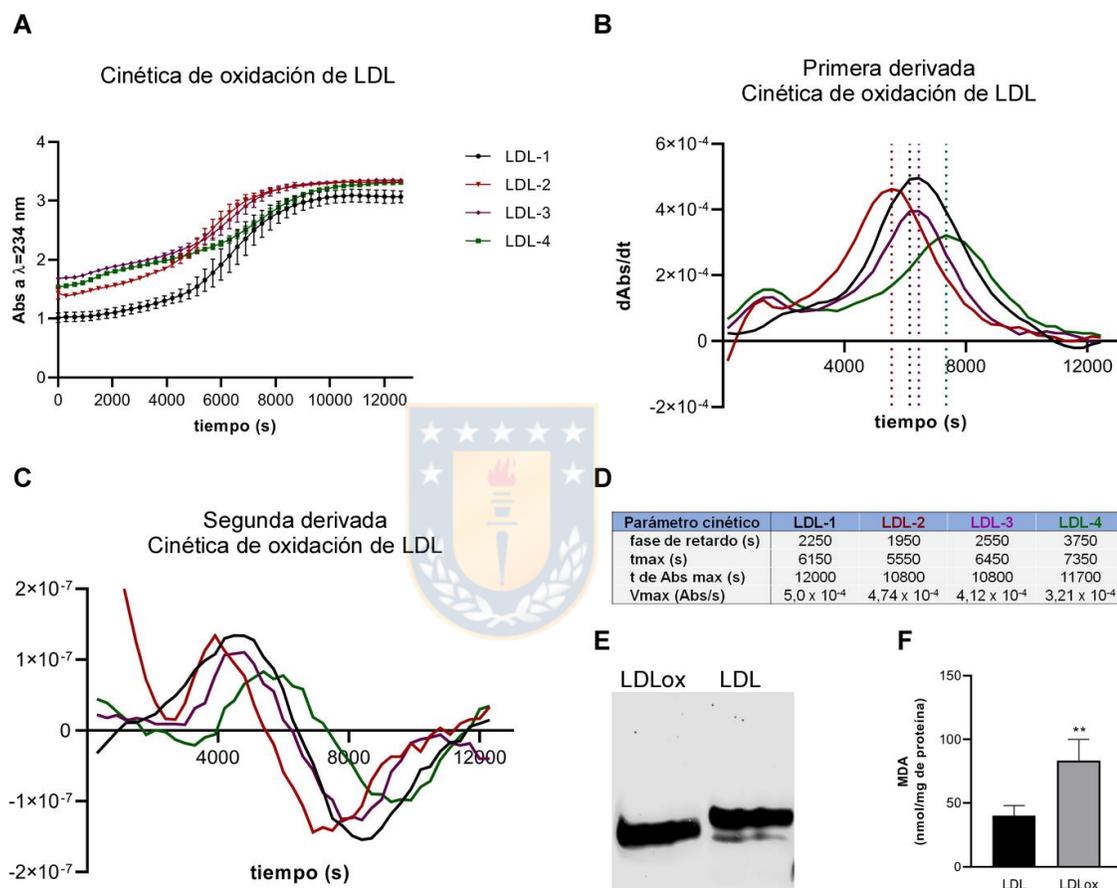


Figura 13. Generación y caracterización de LDL oxidada. La LDL se obtuvo por ultracentrifugación diferencial a partir de una mezcla de plasma de donantes sanos y se oxidó con CuSO_4 ($10 \mu\text{M}$) por 3,5 h. **A)** Monitoreo de la cinética de oxidación de 4 purificaciones de LDL por espectrofotometría a λ 234nm. **B)** Primera derivada de las cinéticas de oxidación. **C)** Segunda derivada de las cinéticas de oxidación. **D)** Resumen de los parámetros cinéticos de las 4 oxidaciones. **E)** Análisis de migración electroforética de LDLox y LDL en gel de agarosa al 1% de la oxidación correspondiente a LDL-1. **F)** Cuantificación de malondialdehído por TBARs. La gráfica representa la media \pm SD, n=4. Prueba t-student, ** p<0,01. Fuente: elaboración propia.

5.4- Análisis del efecto de la LDL oxidada en la viabilidad de las células HCT116 y COLO320

Para determinar el efecto de la LDLox en la viabilidad celular, las células de CCR se incubaron con concentraciones crecientes de LDLox. La viabilidad de las células HCT116 disminuyó significativamente en un 36 % con 150 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox (Figura 14A). En las células COLO320 se observó una disminución significativa de la viabilidad a partir de 75 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox y esta disminución fue mayor con 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox (Figura 14B).

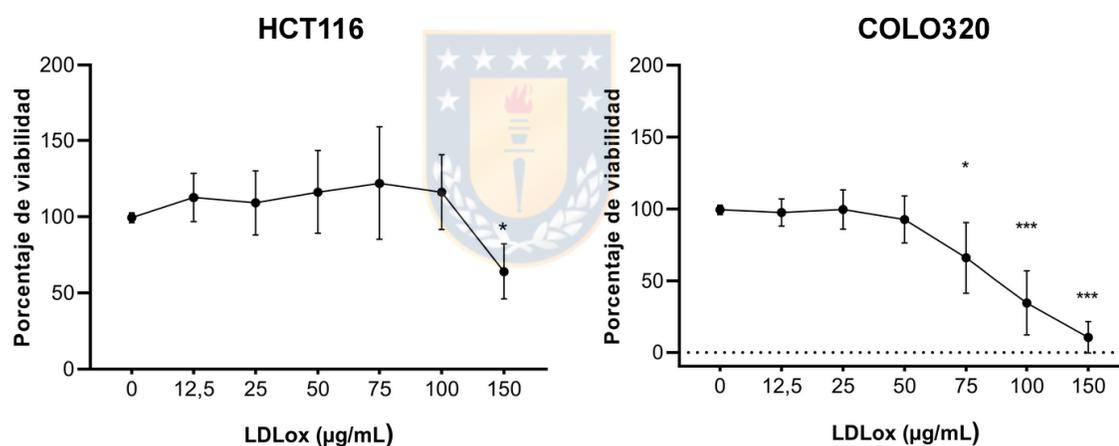


Figura 14. Viabilidad de las células de CCR incubadas con concentraciones crecientes de LDLox. Las células HCT116 y COLO320 se incubaron con diferentes concentraciones de LDLox por 24 h. La viabilidad de las células tratadas con concentraciones crecientes de LDLox se evaluó mediante ensayo de MTT, cada condición se ensayó por triplicado. Los puntos representan la media \pm SD, n=6. Prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Fuente: elaboración propia.

5.5- Análisis del efecto de la lipoproteína de baja densidad oxidada en los niveles de expresión del receptor LOX-1

El efecto de distintas concentraciones de LDLox en los niveles de expresión relativa del receptor LOX-1 se analizó en las líneas celulares de CCR humano COLO320 y HCT116 mediante Western blot. Se utilizaron las concentraciones de 0, 12,5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox.

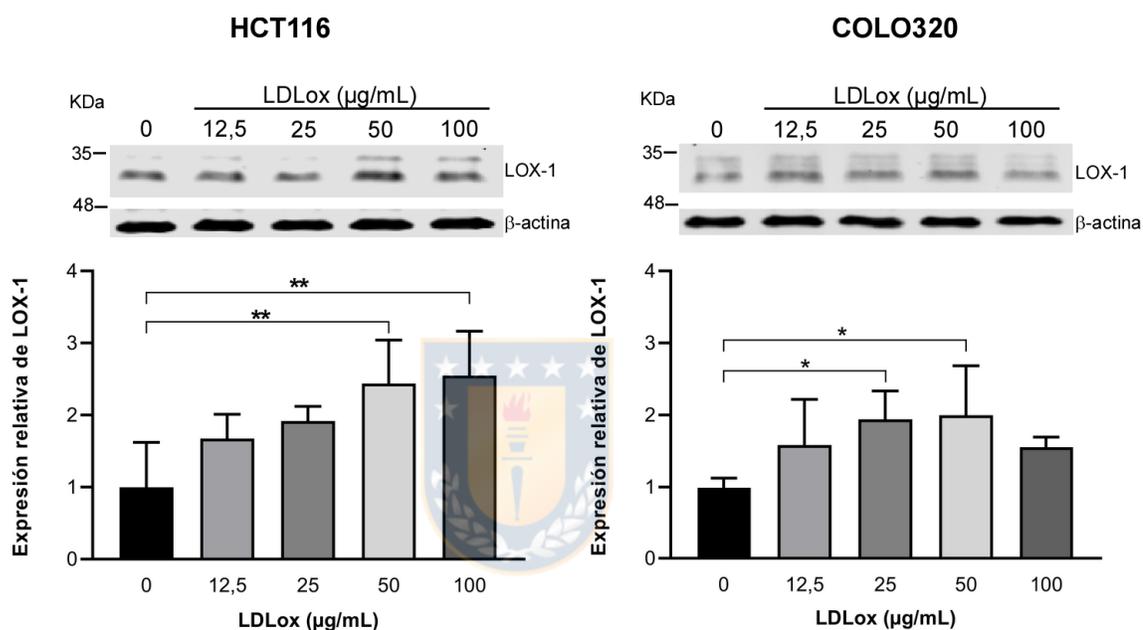


Figura 15. Expresión del receptor LOX-1 en células de CCR tratadas con concentraciones crecientes de LDLox. Las células HCT116 y COLO320 se incubaron con diferentes concentraciones de LDLox por 48 horas y los niveles de expresión del receptor LOX-1 se determinaron por Western blot. La expresión de la proteína β -actina se utilizó como control de carga. La gráfica representa la media \pm SD, $n=5$. Prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Fuente: elaboración propia.

En la línea celular HCT116 se detectó un aumento significativo de los niveles de expresión de LOX-1 de 2,4 y 2,5 veces con concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox, respectivamente (Figura 15). En la línea celular COLO320 la LDLox indujo un aumento significativo de la expresión de LOX-1 de 1,9 y 2,0 veces con concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox, respectivamente (Figura 15).

5.6- La LDL oxidada no estimula la expresión de LOX-1 en las células HCT116 y COLO320 con expresión reducida de este receptor

El efecto de la LDLox sobre la expresión del receptor LOX-1 en las células HCT-LOX(-) y COLO-LOX(-) se analizó mediante qRT-PCR. El tratamiento con LDLox no incrementó la expresión del ARNm del receptor LOX-1 en estas células, a diferencia de las líneas parentales donde se detectó un aumento significativo de la expresión del ARNm del receptor LOX-1 (Figura 16).

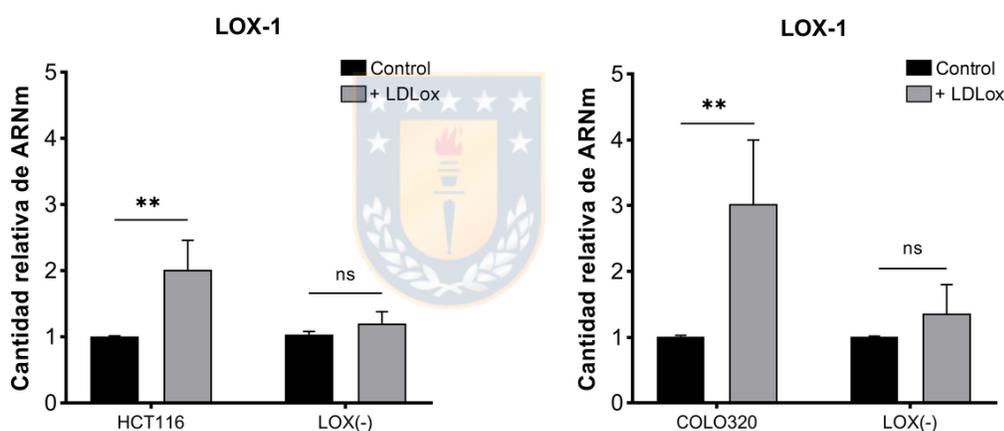


Figura 16: Niveles de expresión relativos del ARNm del receptor LOX-1 en células de CCR con expresión reducida del receptor y tratadas con LDLox. Las células HCT116 y HCT-LOX(-) se trataron con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox; mientras que las células COLO320 y COLO-LOX(-) se trataron con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox por 24 h. La cuantificación se realizó a partir de ARN total y se utilizó como normalizador la expresión de β -actina. Cada condición se ensayó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, $n=3$. Prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn, ** $p<0,01$. Fuente: elaboración propia.

5.7- Análisis del efecto del factor de necrosis tumoral en la viabilidad de las células HCT116 y COLO320 y los niveles de expresión del receptor LOX-1

Para determinar el efecto del TNF- α en la viabilidad celular, las células de CCR

se incubaron con concentraciones crecientes de esta citoquina por 24 h. La viabilidad de las células HCT116 disminuyó significativamente cuando se incubaron con 50 ng/mL de TNF- α . Las concentraciones de TNF- α ensayadas no afectaron significativamente la viabilidad de las células COLO320 (Figura 17).

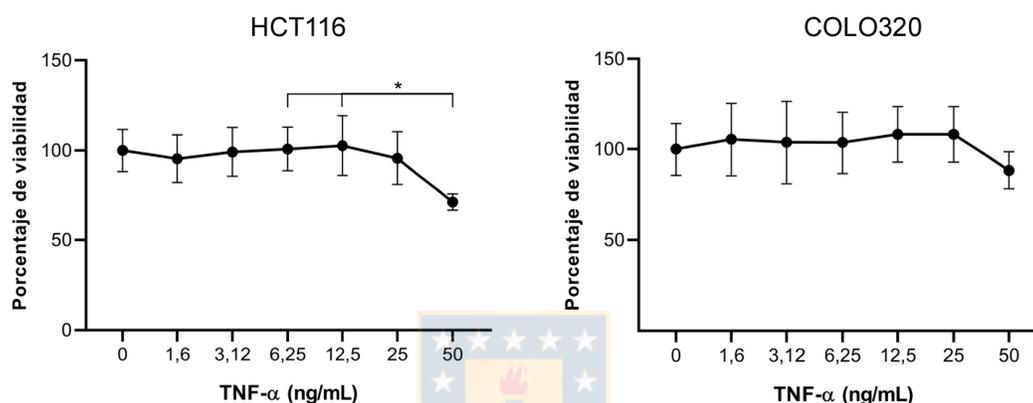


Figura 17: Viabilidad de las células de CCR incubadas con concentraciones crecientes de TNF- α por 24 h. La viabilidad de las células HCT116 y COLO320 tratadas con concentraciones crecientes de TNF- α se evaluó mediante ensayo de MTT. Las células se incubaron con 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25 y 50 ng/mL de TNF- α por 24 h. Cada condición se ensayó por triplicado. Los puntos representan la media \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0,05$. Fuente: elaboración propia.

El efecto de distintas concentraciones de TNF- α en los niveles de expresión relativa del receptor LOX-1 se analizó en las líneas celulares de CCR humano mediante Western blot. En la línea celular HCT116 se detectó un aumento significativo de los niveles de expresión de LOX-1 de 1,6; 1,6 y 1,8 veces con concentraciones de 5, 10 y 20 ng/mL de TNF- α , respectivamente (Figura 18).

En la línea celular COLO320 el TNF- α indujo un aumento significativo de la expresión de LOX-1 de 1,6 y 1,5 veces con concentraciones de 10 y 15 ng/mL,

respectivamente (Figura 18). El tratamiento con 10 ng/mL de TNF- α incrementó significativamente la expresión del receptor LOX-1 en ambas líneas celulares.

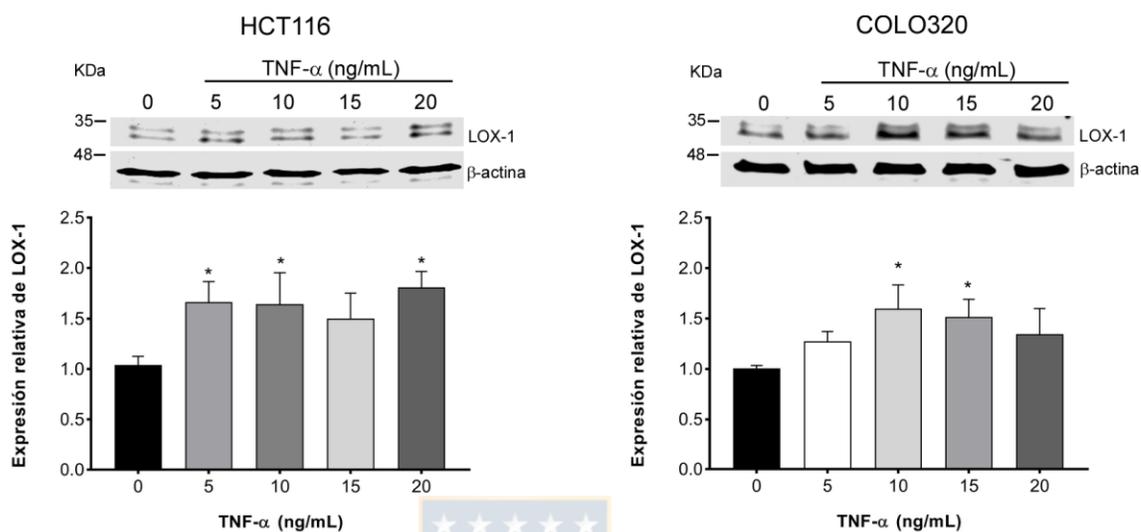


Figura 18: Expresión del receptor LOX-1 en las células HCT116 y COLO320 tratadas con concentraciones crecientes de TNF- α . Los niveles de expresión del receptor LOX-1 se analizaron por Western blot. Las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de TNF- α (0, 5, 10, 15 y 20 ng/mL) por 24 horas. La expresión de la proteína β -actina se utilizó como control de carga. Las barras representan la media \pm SD, n = 3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunnett, * p<0,05. Fuente: elaboración propia.

Adicionalmente, el efecto de 10 ng/mL de TNF- α en la expresión relativa del receptor LOX-1 se corroboró mediante RT-PCR cuantitativo. En ambas líneas celulares se detectó un aumento significativo de la expresión del ARNm del receptor LOX-1 (Figura 19A). En las células HCT116 los niveles de expresión aumentaron 1,3 veces y en las células COLO320 1,6 veces respecto al control. Además, se realizó una cinética de expresión del receptor LOX-1 en las células estimuladas con esta concentración de TNF- α . En la línea celular HCT116 se detectó un aumento significativo de los niveles de expresión de LOX-1 de 1,5 y

1,6 veces a las 12 y 24 h, respectivamente. En la línea celular COLO320 el TNF- α indujo un aumento significativo de la expresión de LOX-1 de 1,5 veces a las 12 h. En ambas líneas celulares se detectó un aumento significativo de la expresión del receptor LOX-1 a las 12 h postratamiento (Figura 19B).

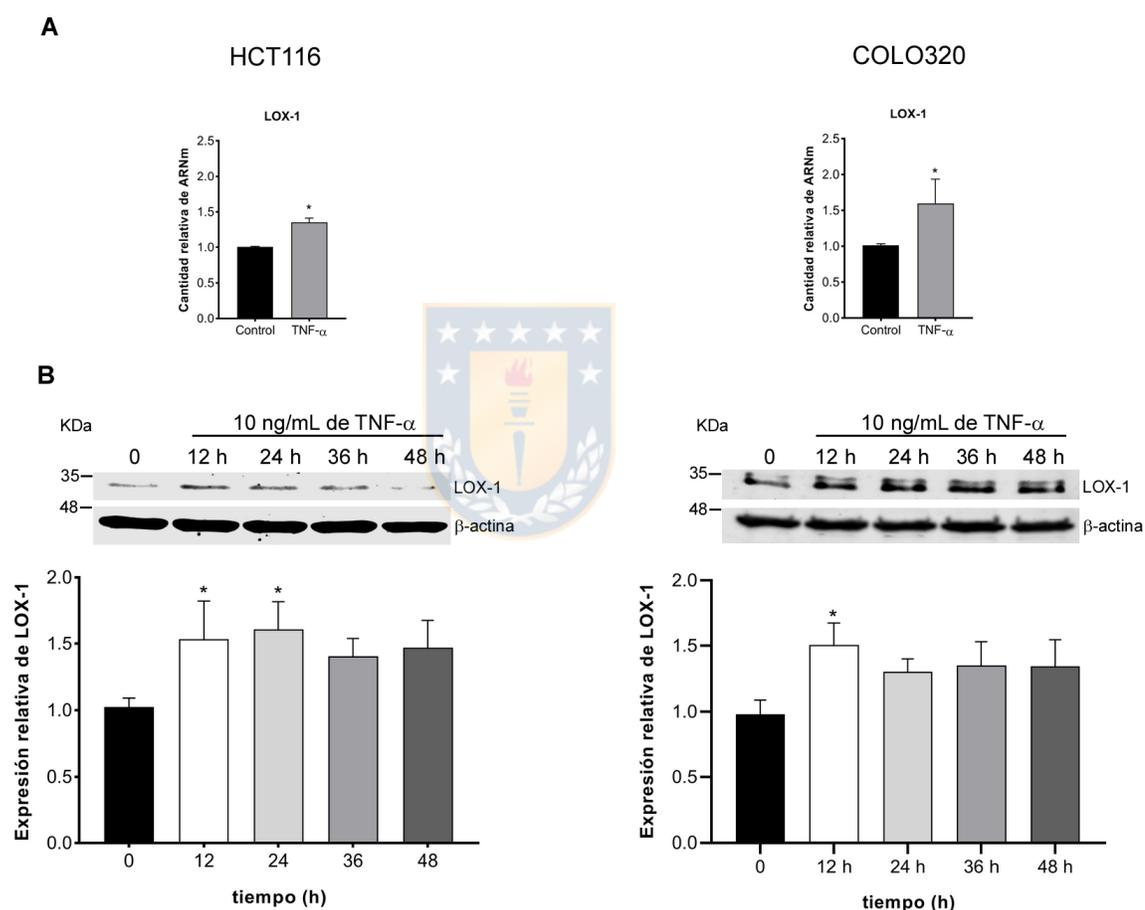


Figura 19: Efecto del TNF- α sobre la expresión de LOX-1 en las células HCT116 y COLO320. A) Niveles de expresión relativa del ARNm del receptor LOX-1 en células de CCR incubadas con 10 ng/mL de TNF- α por 12 h. Las cuantificaciones se realizaron a partir de ARN total y se utilizó como normalizador la expresión de β -actina. Cada condición se ensayó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=4. Prueba t-student con corrección de Welch, * p<0,05. **B)** Cinética de expresión del receptor LOX-1 en células de CCR. Las células se estimularon con 10 ng/mL de TNF- α por 12, 24, 36 y 48 h y los niveles de expresión del receptor LOX-1 se analizaron por Western blot. Las barras representan la media \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunnett, * p<0,05. Fuente: elaboración propia.

Con estos resultados, se seleccionó la concentración de 10 ng/mL de TNF- α y un tiempo de sensibilización de 12 h con esta citoquina para realizar los tratamientos combinados de TNF- α y LDLox.

5.8- El factor de necrosis tumoral alfa y la LDL oxidada no muestran un efecto sinérgico en la expresión del receptor LOX-1

El efecto de los tratamientos combinados con TNF- α y LDLox sobre la expresión del receptor LOX-1 se analizó en las células HCT116, HCT-LOX(-), COLO320 y COLO-LOX(-) por RT-PCR en tiempo real. En las dos líneas parentales el tratamiento con LDLox y el cotratamiento aumentaron significativamente la expresión del receptor LOX-1 en comparación con el control. Sin embargo, no se detectó un efecto sinérgico en la expresión de LOX-1 en la condición de cotratamiento en comparación con las células tratadas con LDLox (Figura 20A). En las células HCT-LOX(-) y COLO-LOX(-) las condiciones ensayadas no indujeron un aumento significativo de la expresión del ARNm codificante para el receptor LOX-1 (Figura 20A). Adicionalmente, en las células HCT116 y COLO320 se determinó la expresión del receptor por Western blot en las distintas condiciones ensayadas. En ambas líneas celulares no se observó un efecto sinérgico del cotratamiento en la expresión del receptor LOX-1 en comparación con las células tratadas con LDLox (Figura 20B).

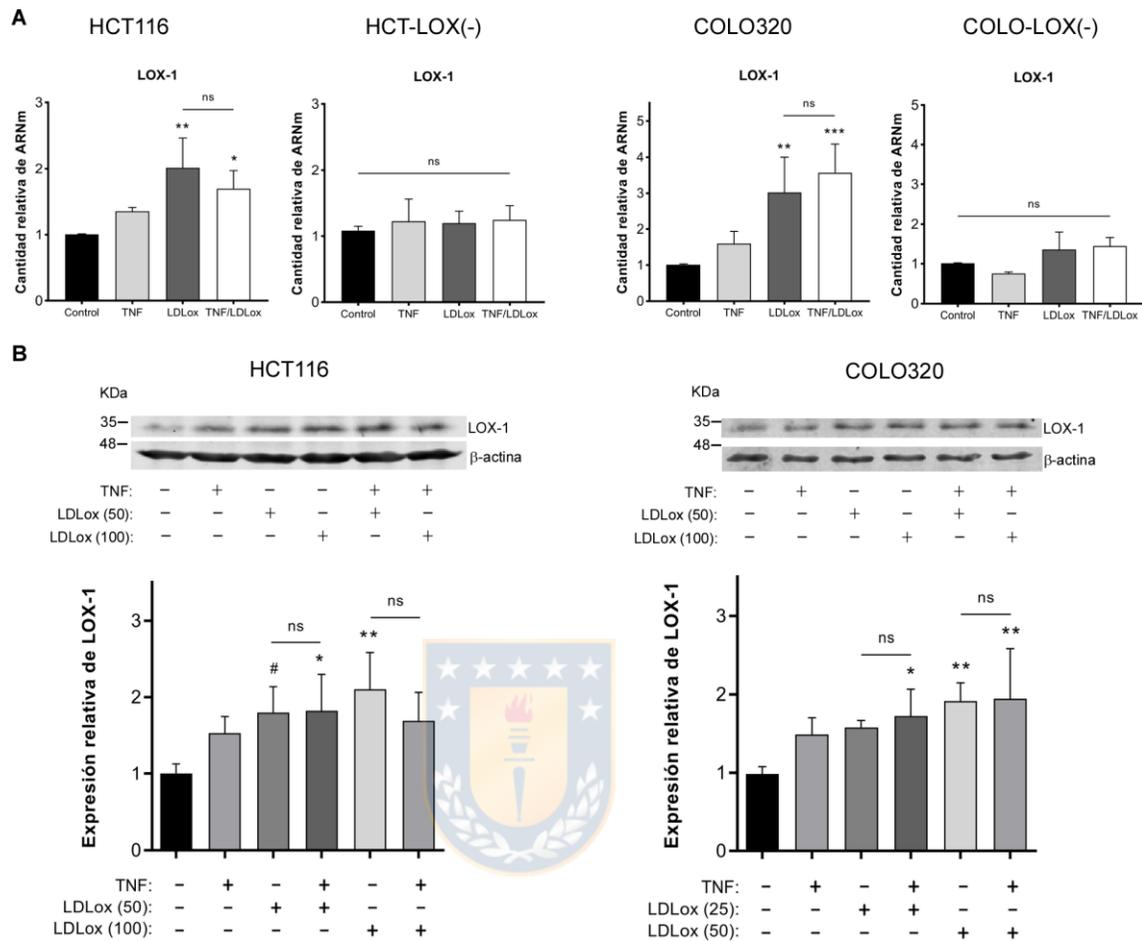


Figura 20: Efecto del tratamiento combinado de TNF- α y LDLox sobre la expresión del receptor LOX-1 en las células HCT116, HCT-LOX(-), COLO320 y COLO-LOX(-). **A)** Niveles de expresión relativa del ARNm del receptor LOX-1. Las células de CCR se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α por 12 h, posteriormente las células COLO320 y COLO-LOX(-) se trataron con 50 μ g/mL de LDLox y las células HCT116 y HCT-LOX(-) con 100 μ g/mL de LDLox por 24 h. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. HCT116: Prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn. HCT-LOX(-), COLO320 y COLO-LOX(-): ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * p<0,05 vs control; ** p<0,01 vs control; *** p<0,001 vs control. **B)** Expresión del receptor LOX-1 en células HCT116 y COLO320 evaluado por Western blot. Las células se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α por 12 h, posteriormente se trataron por 48 h con 50 y 100 μ g/mL de LDLox para las células HCT116 y con 25 y 50 μ g/mL de LDLox para las células COLO320. La expresión de la proteína GAPDH se utilizó como control de carga. Las barras representan la media \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * p<0,05 vs control; ** p<0,01 vs control. Fuente: elaboración propia.

5.9- La LDL oxidada estimula la proliferación de las células humanas de cáncer colorrectal COLO320 y HCT116

Para evaluar el efecto de la LDL oxidada sobre la proliferación de las células de CCR mediante ensayo de MTT se determinó la relación existente entre la cantidad de células y la absorbancia a 570 nm. Se obtuvo una correlación lineal entre el número de células y la absorbancia para ambas líneas celulares; $R^2=0,96$ para las células HCT116 y $R^2=0,97$ para las células COLO320 (Figura 21).

El efecto de la LDLox en la proliferación de las células HCT116 y COLO320 se estudió al incubar las células con concentraciones crecientes de LDLox (12,5, 25, 50, 75, 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$) por 48, 72 y 96 h. Se determinó que los tratamientos con LDLox incrementan significativamente la proliferación de ambas líneas celulares (Figura 22).

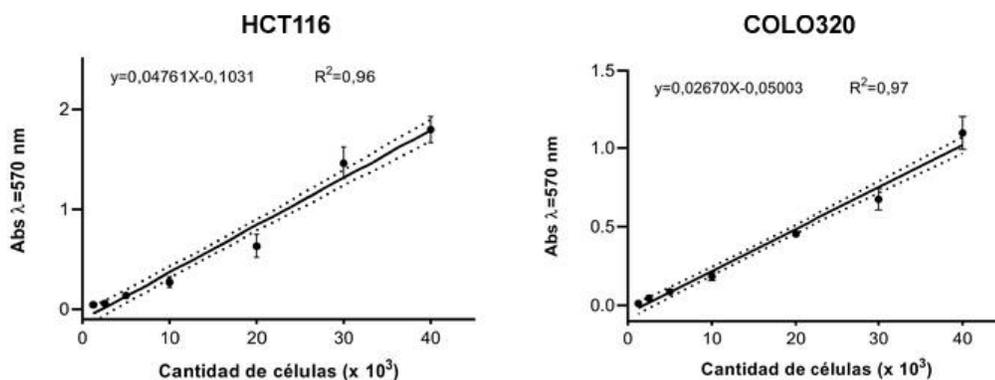


Figura 21. Linealidad de ensayo de MTT. Las células se sembraron por octuplicado a densidades de 1250, 2500, 5000, 10 000, 20 000, 30 000 y 40 000 células por pocillo. Después de 24 h se realizó el ensayo de MTT. Los resultados se expresan como absorbancia \pm SD. La linealidad se determinó mediante análisis de regresión lineal. Fuente: elaboración propia.

En las células HCT116 se observó un aumento significativo de la proliferación a las 48 h cuando se trataron con 12,5, 25, 75 y 150 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox en comparación a las células sin tratamiento. A las 72 h, la proliferación fue significativamente mayor en las células tratadas con 12,5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox.

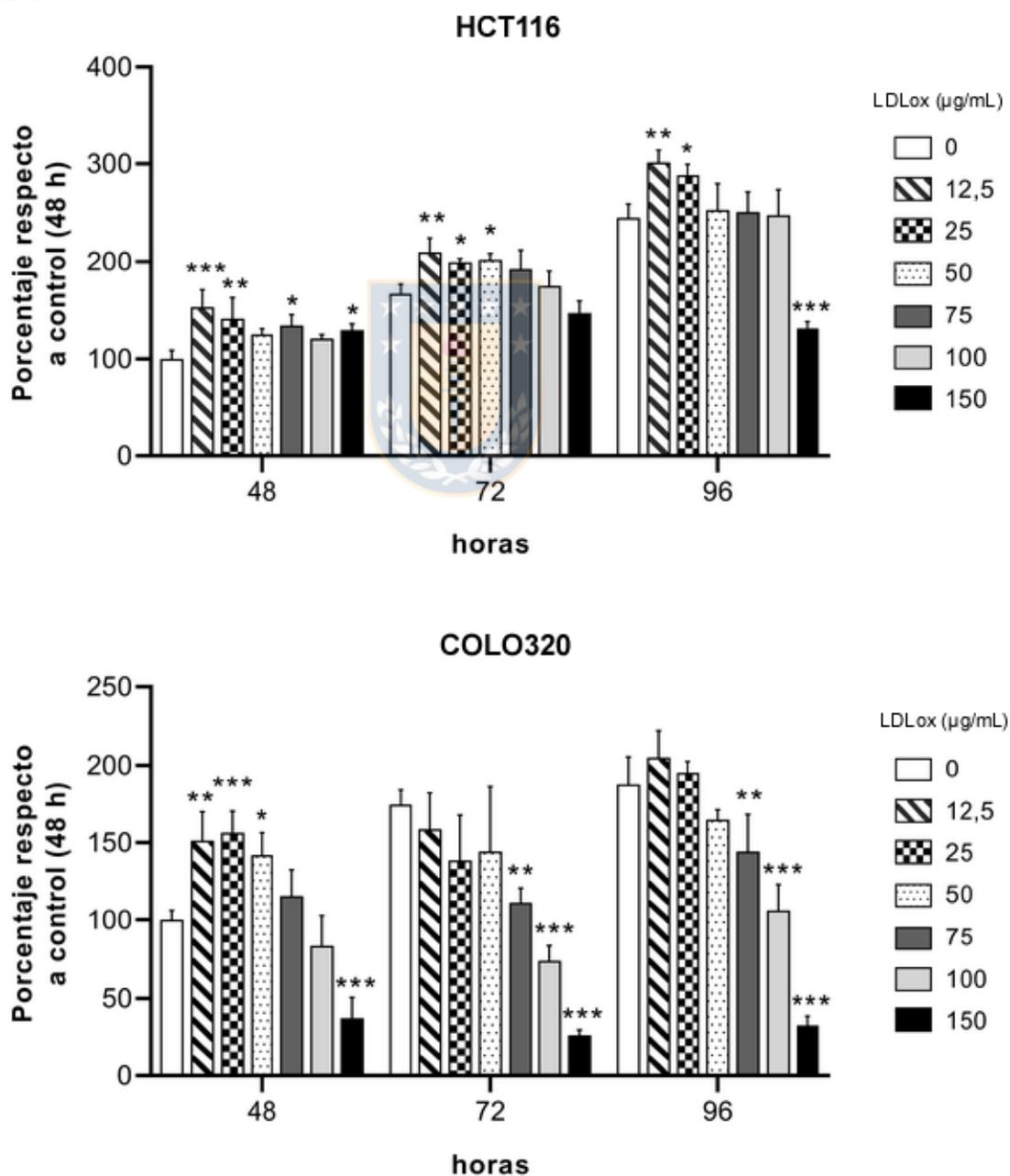


Figura 22: Proliferación de células de cáncer colorrectal tratadas con concentraciones crecientes de LDLox evaluado por MTT. Las células HCT116 y COLO320 se incubaron con concentraciones crecientes de LDLox (0, 12,5, 25, 50, 75, 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48, 72 y 96 h en medio con 2 % de SFB y se analizó la proliferación celular por ensayo de MTT. Cada condición se ensayó por triplicado. Las barras representan la media del porcentaje de proliferación respecto al control sin tratamiento con LDLox de las 48 h \pm SD, n=4. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0,05$ vs control, ** $p < 0,01$ vs control, *** $p < 0,001$ vs control. Fuente: elaboración propia.

La proliferación a las 96 h se mantuvo de manera significativa en las células tratadas con las concentraciones de 12,5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox en comparación a las células sin tratamiento (Figura 22). Sin embargo, en las células COLO320 solamente a las 48 h se observó un aumento significativo de la proliferación con las concentraciones de LDLox de 12,5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación a las células sin tratamiento (Figura 22).

El efecto proliferativo de la LDLox en las células de CCR se corroboró mediante conteo de las células teñidas con el colorante de exclusión azul de tripán. Para ambas líneas celulares se ensayaron las concentraciones de LDLox que en los experimentos de MTT indujeron mayor aumento de la viabilidad celular (12,5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además, se incluyó una condición experimental con una concentración menor de LDLox (6,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 23).

En las células HCT116 se observó un aumento significativo de la proliferación a las 48 h en las células tratadas con 12,5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox en comparación a las células sin tratamiento. A las 72 y 96 h, la proliferación celular fue significativamente mayor en las 4 condiciones estudiadas en comparación con las células sin tratar (Figura 23).

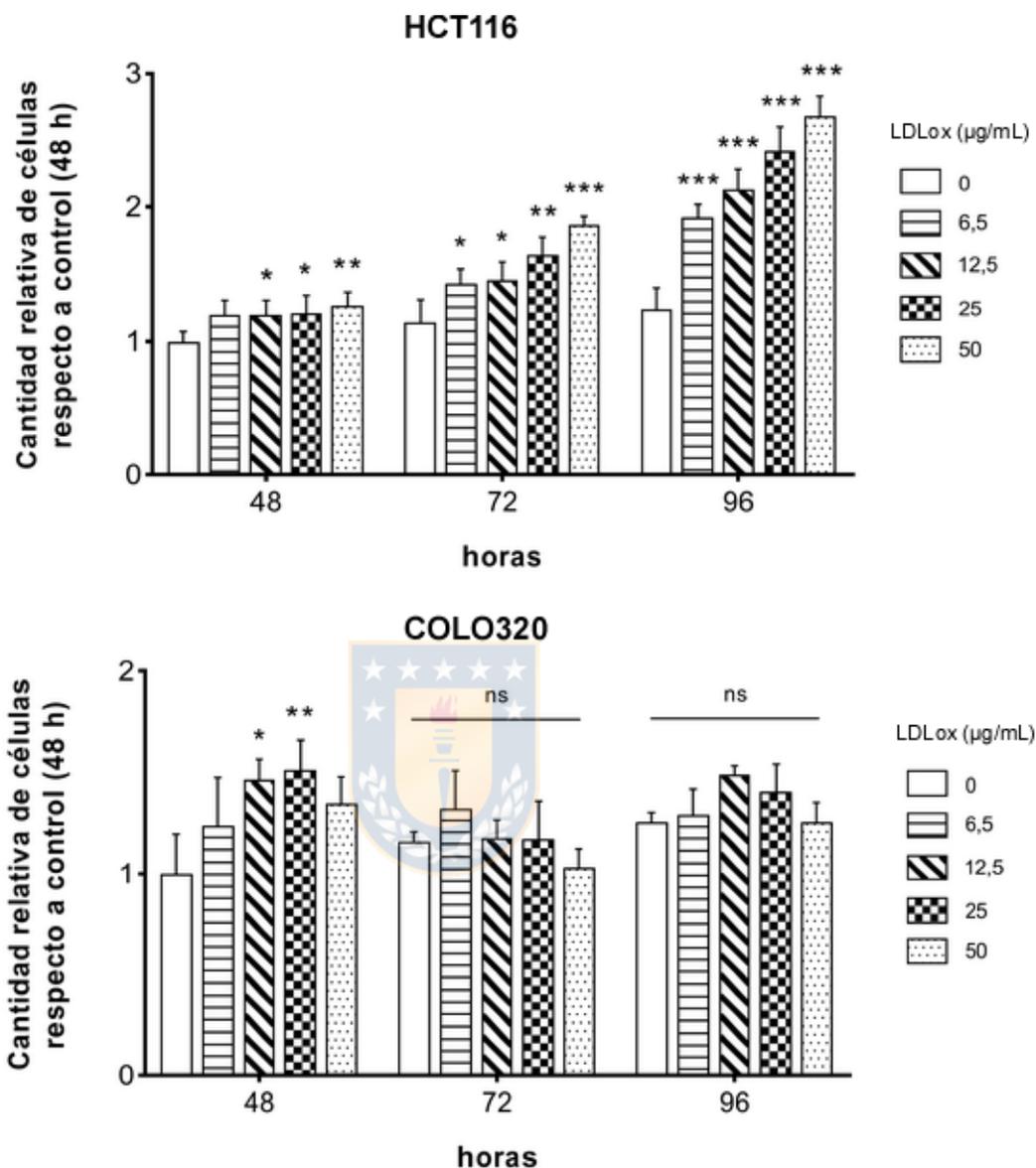


Figura 23: Proliferación de células de cáncer colorrectal tratadas con concentraciones crecientes de LDLox (azul de tripán). Las células de CCR se incubaron con concentraciones crecientes de LDLox (0, 6,5, 12,5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$) por 48 h en medio con 2 % de SFB y se contó el número de células con el colorante azul de tripán. Las células HCT116 también se analizaron a las 72 y 96 h. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media de la cantidad relativa de células respecto al control sin tratamiento con LDLox de las 48 h \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0,05$ vs control, ** $p < 0,01$ vs control *** $p < 0,001$ vs control. Fuente: elaboración propia.

En las células COLO320 se observó un aumento significativo de la proliferación a las 48 h en las células incubadas con 12,5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox en comparación a las células sin tratamiento. En estas células no se observaron diferencias significativas en el crecimiento celular a las 72 y 96 h entre las células no tratadas y las células tratadas con las diferentes concentraciones de LDLox (Figura 23).

5.10- El factor de necrosis tumoral alfa y la LDL oxidada no tienen efecto sinérgico en la proliferación de las células COLO320 y HCT116

El efecto del cotratamiento sobre la proliferación de las células de CCR se analizó mediante conteo con el colorante azul de tripán. En todas las condiciones estudiadas no se observó un efecto sinérgico del cotratamiento en comparación con las células tratadas con LDLox. En las células HCT116 a las 72 y 96 h, el cotratamiento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox disminuye significativamente la proliferación celular en comparación con el tratamiento con LDLox. Este efecto se observó en las células COLO320 a las 96 h cotratadas con 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox (Figura 24).

5.11- La LDL oxidada modula la expresión de marcadores involucrados en transición epitelio-mesenquimal en células humanas de CCR

La transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un proceso en el que las células epiteliales adquieren características mesenquimales. En cáncer, la TEM se

asocia con migración, invasión, resistencia a apoptosis y anoikis¹⁶⁰. Analizamos el efecto del TNF- α , la LDLox y el cotratamiento sobre la expresión del ARNm de marcadores de TEM en las células de CCR por RT-PCR cuantitativo. Los marcadores estudiados fueron E-Cadherina, Vimentina, N-Cadherina, Snail, Slug, Twist, ZEB1, ZEB2, BCL2 y BCL-x.

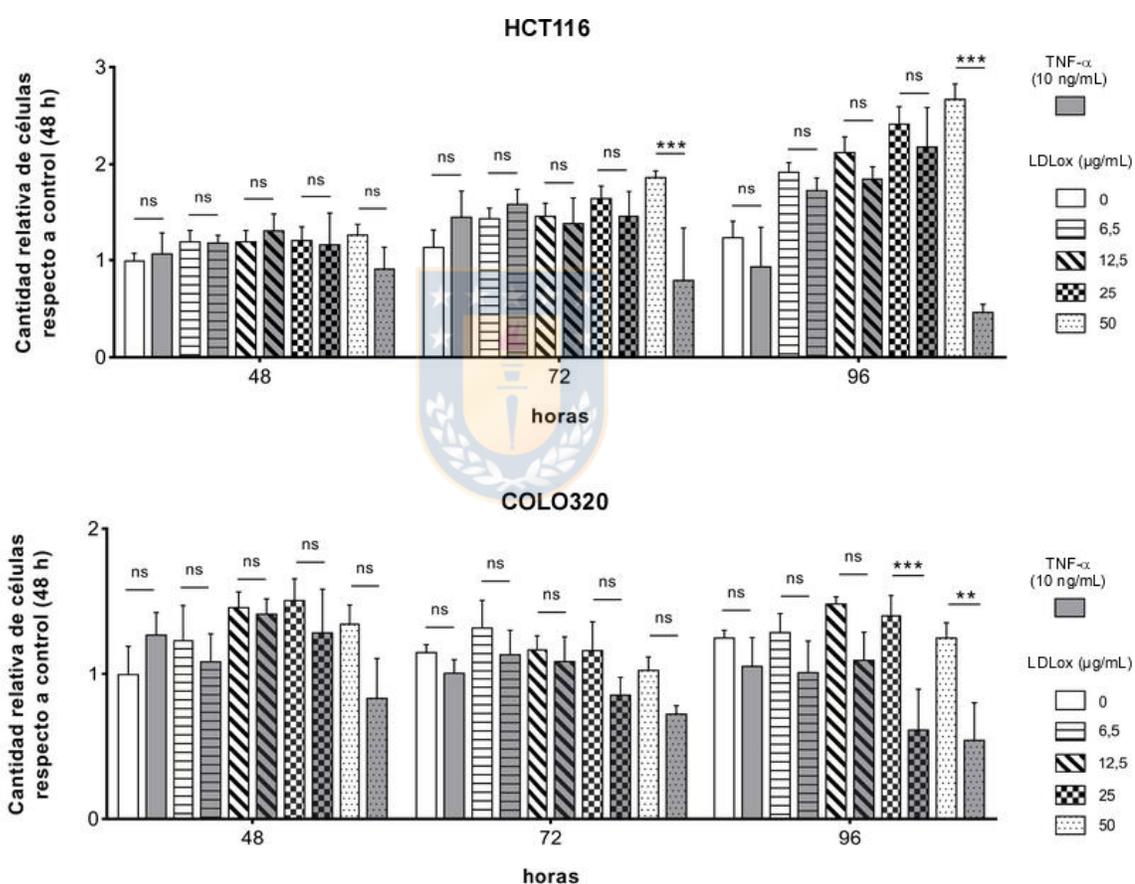


Figura 24: Proliferación de células de cáncer colorrectal tratadas con TNF- α y LDLox (azul de tripán). Las células de CCR se incubaron por 12 h con 10 ng/mL de TNF- α ; posteriormente con concentraciones crecientes de LDLox (6,5; 12,5, 25 y 50 μ g/mL) por 48 h en medio con 2 % de SFB y se contó el número de células con el colorante azul de tripán. Las células HCT116 también se analizaron a las 72 y 96 h. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media de la cantidad relativa de células respecto al control sin tratamiento con LDLox de las 48 h \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, *** p<0,001. Fuente: elaboración propia.

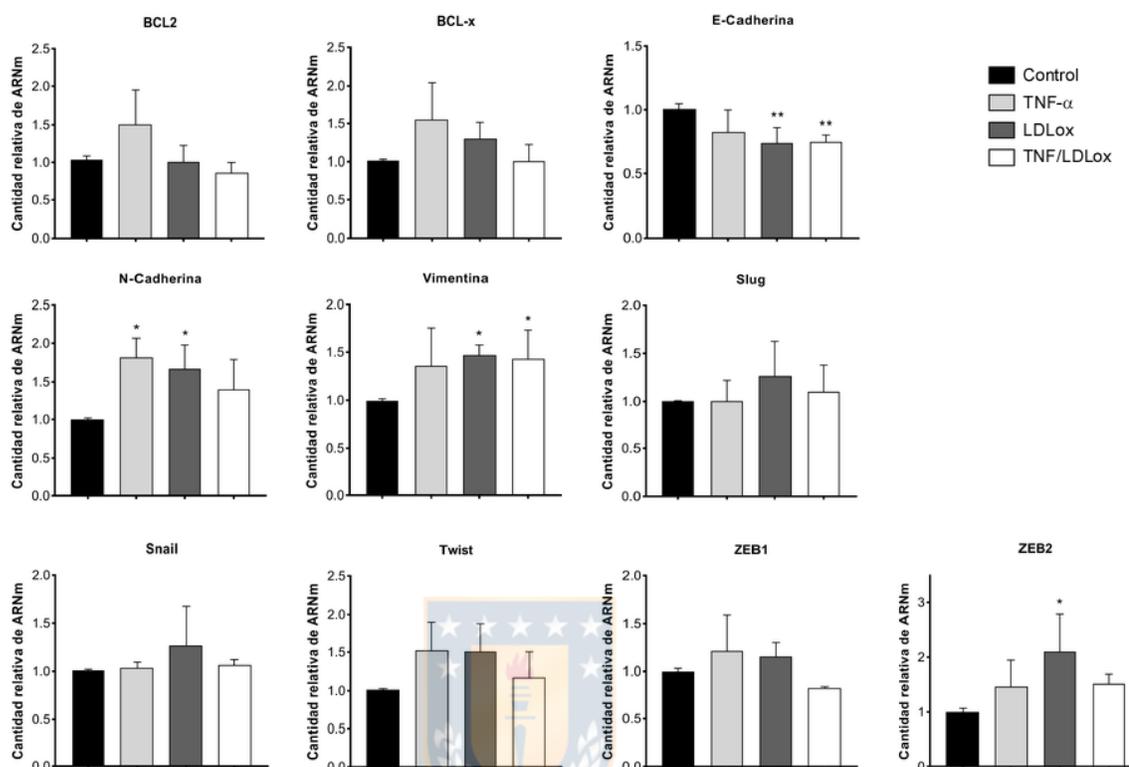


Figura 25: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en las células HCT116. Expresión relativa del ARNm codificante para BCL2, BCL-x, E-Cadherina, N-Cadherina, Vimentina, Slug, Snail, Twist, ZEB1 y ZEB2 en células HCT116. Las células se incubaron por 12 h con 10 ng/mL de TNF- α (grupos TNF y TNF/LDLox) o medio de cultivo (grupos control y LDLox); posteriormente se incubaron por 24 h con 100 μ g/mL de LDLox (grupos LDLox y TNF/LDLox). Las cuantificaciones se realizaron a partir de ARN total por PCR en tiempo real y se utilizó como normalizador la expresión de β -actina. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. BCL2, BCL-x, E-Cadherina, N-Cadherina, Slug, Snail, Twist, ZEB1 y ZEB2: ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey. Vimentina: prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn, * p < 0,05 vs control, ** p < 0,01 vs control. Fuente: elaboración propia.

Se observó una disminución significativa de la expresión de E-Cadherina en la condición tratada con LDLox de un 26 % y 35 % para las células HCT116 y COLO320 respectivamente, en comparación con las células no tratadas. En las células HCT116 el cotratamiento indujo una disminución significativa de este marcador en un 25 %.

Sin embargo, en las células COLO320 el cotratamiento no indujo disminución significativa de E-Cadherina. El TNF- α no disminuyó de manera significativa la expresión este marcador en las células de CCR (Figura 25 y Figura 26).

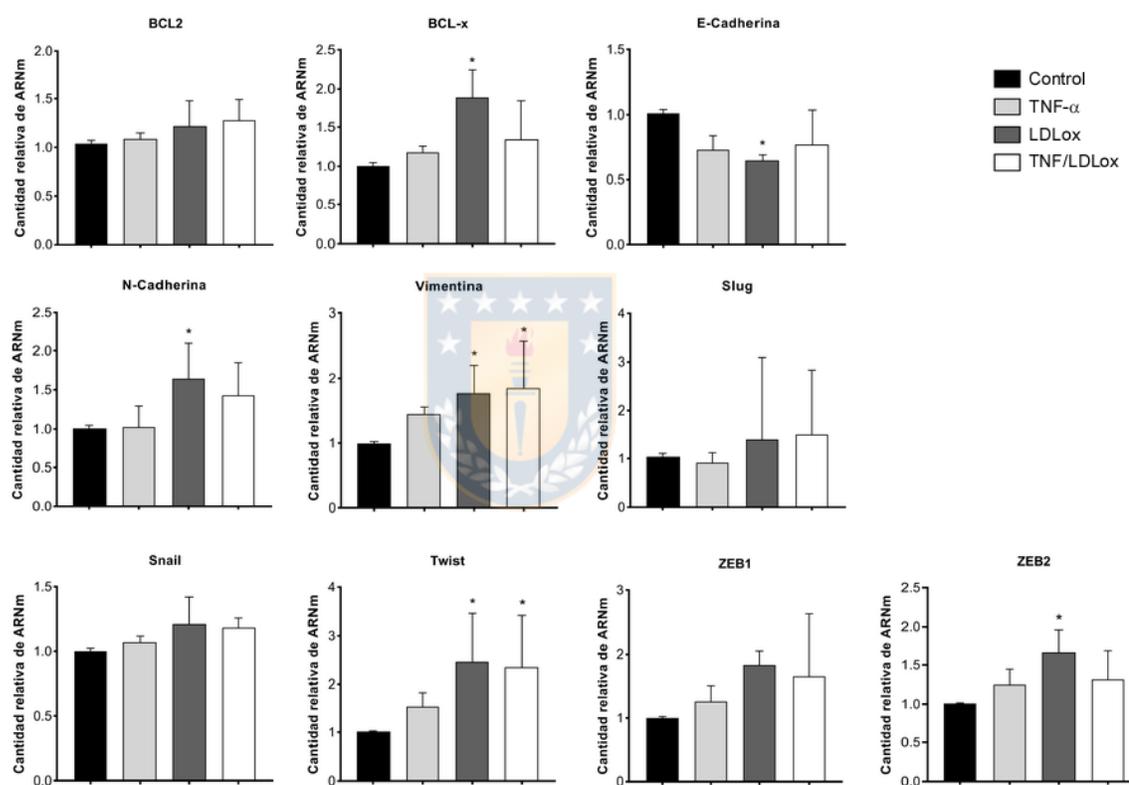


Figura 26: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal en las células COLO320. Expresión relativa del ARNm codificante para BCL2, BCL-x, E-Cadherina, N-Cadherina, Vimentina, Slug, Snail, Twist, ZEB1 y ZEB2 en células COLO320. Las células se incubaron por 12 h con 10 ng/mL de TNF- α (grupos TNF y TNF/LDLox) o medio de cultivo (grupos control y LDLox); posteriormente se incubaron por 24 h con 50 μ g/mL de LDLox (grupos LDLox y TNF/LDLox). Las cuantificaciones se realizaron a partir de ARN total por PCR en tiempo real y se utilizó como normalizador la expresión de β -actina. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. BCL2, BCL-x, E-Cadherina, N-Cadherina, Snail, ZEB1 y ZEB2: ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey. Vimentina, Slug y Twist: prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn, * $p < 0,05$ vs control. Fuente: elaboración propia.

El tratamiento con LDLox indujo un aumento significativo de la expresión de N-Cadherina en ambas líneas celulares en comparación con las células no tratadas. Este aumento fue de 1,7 y 1,6 veces para las células HCT116 y COLO320, respectivamente. El cotratamiento no indujo un aumento significativo de este marcador en ambas líneas celulares. El TNF- α indujo un aumento significativo de la expresión de N-Cadherina en las células HCT116 (Figura 25 y Figura 26).

En ambas líneas celulares tanto el tratamiento con LDLox como el cotratamiento incrementaron significativamente la expresión de Vimentina. En las células HCT116 el aumento fue de 1,5 y 1,4 veces, respectivamente. En las células COLO320 fue de 1,7 y 1,8 veces, respectivamente. El TNF- α no indujo aumento significativo de la expresión de este marcador en ambas líneas celulares (Figura 25 y Figura 26).

En las células COLO320, el tratamiento con LDLox y el cotratamiento indujeron un aumento significativo del factor transcripcional Twist de 2,5 y 2,3 veces, respectivamente. Sin embargo, este efecto no se detectó en las células HCT116. El TNF- α no indujo un aumento significativo de la expresión de Twist en ambas líneas celulares (Figura 25 y Figura 26).

El tratamiento con LDLox indujo un aumento significativo de la expresión del factor transcripcional ZEB2 en ambas líneas celulares en comparación con las células no tratadas. Este aumento fue de 1,7 y 2,1 veces para las células HCT116 y COLO320, respectivamente. Las condiciones de TNF- α y cotratamiento no

incrementaron significativamente la expresión de este marcador en estas células (Figura 25 y Figura 26).

En las células COLO320, el tratamiento con LDLox indujo un aumento significativo del marcador anti apoptótico BCL-x de 1,9 veces en comparación con las células no tratadas. Este efecto no se detectó en las células HCT116. Además, el TNF- α no indujo un aumento significativo de la expresión de este marcador en ambas líneas celulares (Figura 25 y Figura 26).

Para el marcador anti-apoptótico BCL2 y los factores transcripcionales Slug, Snail y ZEB1 no se detectaron diferencias significativas en las condiciones ensayadas en comparación con el grupo control. Finalmente, el cotratamiento con TNF- α y LDLox no indujo un aumento significativo de la expresión de los genes analizados en comparación con la condición tratada con LDLox (Figura 25 y Figura 26).

Adicionalmente, la expresión de los marcadores E-Cadherina, Vimentina, N-Cadherina y Slug se analizó por Western blot. En las células HCT116 el tratamiento con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox indujo un aumento significativo de Vimentina y una disminución significativa de E-Cadherina respecto a las células no tratadas. El tratamiento con TNF- α indujo un aumento significativo de la expresión de Vimentina (Figura 27). La expresión de la proteína N-Cadherina no se detectó en estas células.

En las células COLO320, los tratamientos con 25 y 50 µg/mL de LDLox estimularon significativamente la expresión de Vimentina y N-Cadherina en comparación con las células control (Figura 27). La expresión de la proteína E-

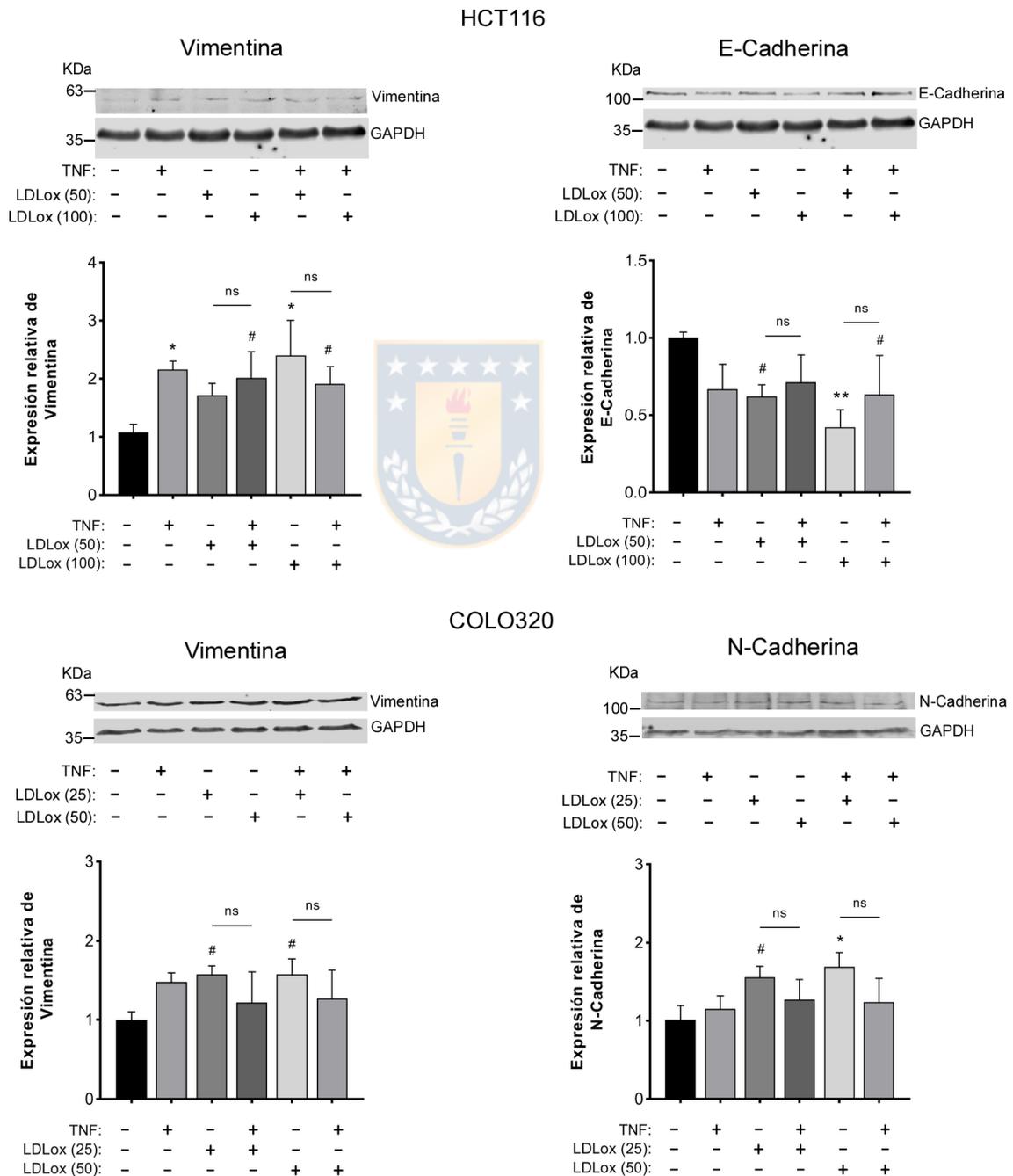


Figura 27: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de Vimentina, E-Cadherina y N-Cadherina en células HCT116 y COLO320. Las células se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α por 12 h, posteriormente se trataron por 48 h con 50 y 100 μ g/mL de LDLox para las células HCT116 y con 25 y 50 μ g/mL de LDLox para las células COLO320. La expresión de la proteína GAPDH se utilizó como control de carga. Las barras representan la media \pm SD, n=3. (*) ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * p<0,05 vs control, ** p<0,01 vs control. (#) ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunnett, # p<0,05 vs control. Nota: el orden de aplicación en el gel difiere del orden graficado. Fuente: elaboración propia.

Cadherina no se detectó en estas células. Para ambas líneas celulares no se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de Slug en las condiciones analizadas (datos no mostrados). Los cotratamientos con TNF- α y LDLox no estimularon significativamente la expresión de los marcadores estudiados en comparación con las condiciones tratadas con LDLox.

5.12- Las variaciones inducidas por la LDL oxidada sobre la expresión de marcadores involucrados en transición epitelio-mesenquimal en las células HCT116 y COLO320 son mediadas por el receptor LOX-1

Para determinar si los efectos detectados en los niveles de expresión de los marcadores de TEM inducidos por la LDLox dependen del receptor LOX-1 se incubaron las células HCT-LOX(-) y COLO-LOX(-) con la lipoproteína modificada. La expresión del ARNm de estos marcadores se analizó por RT-PCR cuantitativo y los resultados se compararon con las células parentales con expresión basal del receptor LOX-1.

Los tratamientos con LDLox en las células con expresión disminuida del receptor LOX-1 no indujeron cambios significativos en la expresión de los marcadores estudiados (Figura 28 y Figura 29). A diferencia del resultado obtenido en los experimentos de cotratamiento, en las células HCT116 tratadas con LDLox se detectó un aumento significativo de la expresión del ARNm de Twist en

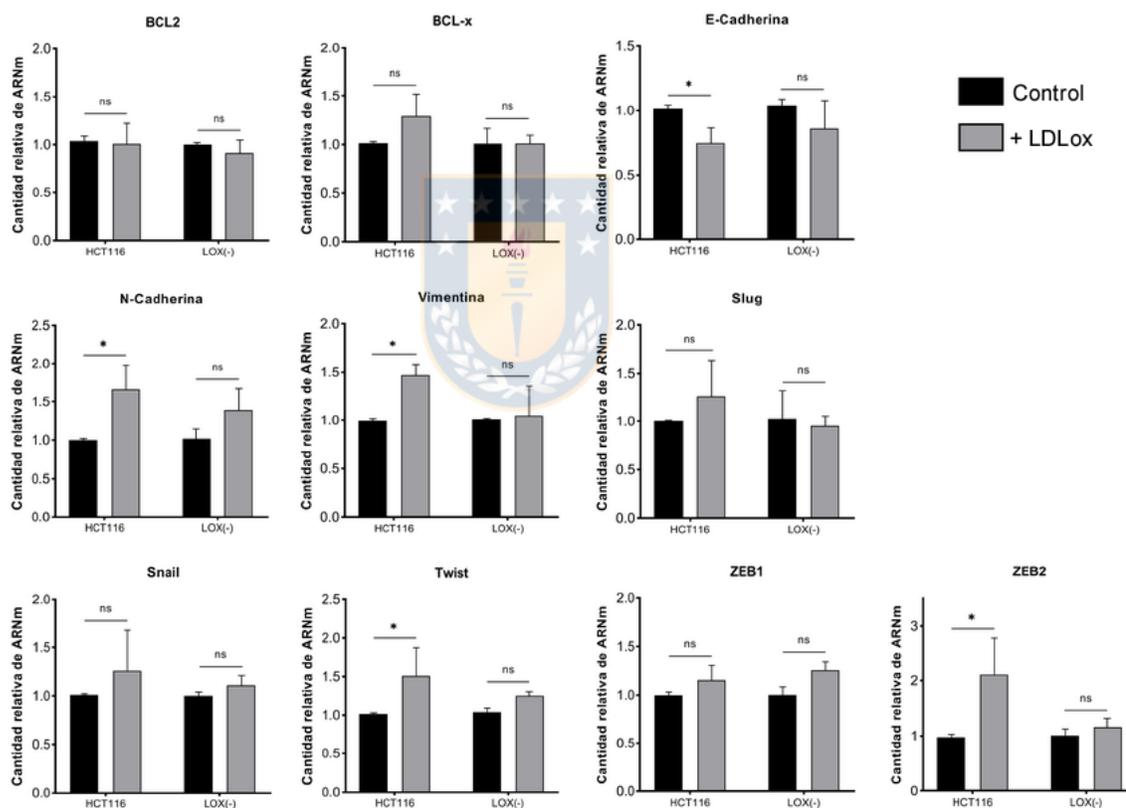


Figura 28: Niveles de expresión relativos de marcadores de TEM en las células de CCR HCT116 con expresión apagada del receptor y tratadas con LDLox. Expresión relativa del ARNm codificante para BCL2, BCL-x, E-Cadherina, N-Cadherina, Vimentina, Slug, Snail, Twist, ZEB1 y ZEB2 en células HCT116 y HCT-LOX(-). Las células se incubaron con 100 µg/mL de LDLox por 24 h. Las cuantificaciones se realizaron a partir de ARN total por PCR en tiempo real y se utilizó como normalizador la expresión de β -actina. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * p<0,05. Fuente: elaboración propia.

comparación con las células no tratadas (Figura 28). Además, en las células COLO320 el tratamiento con LDLox indujo un aumento significativo de la expresión de ZEB1 en comparación con las células no tratadas (Figura 29).

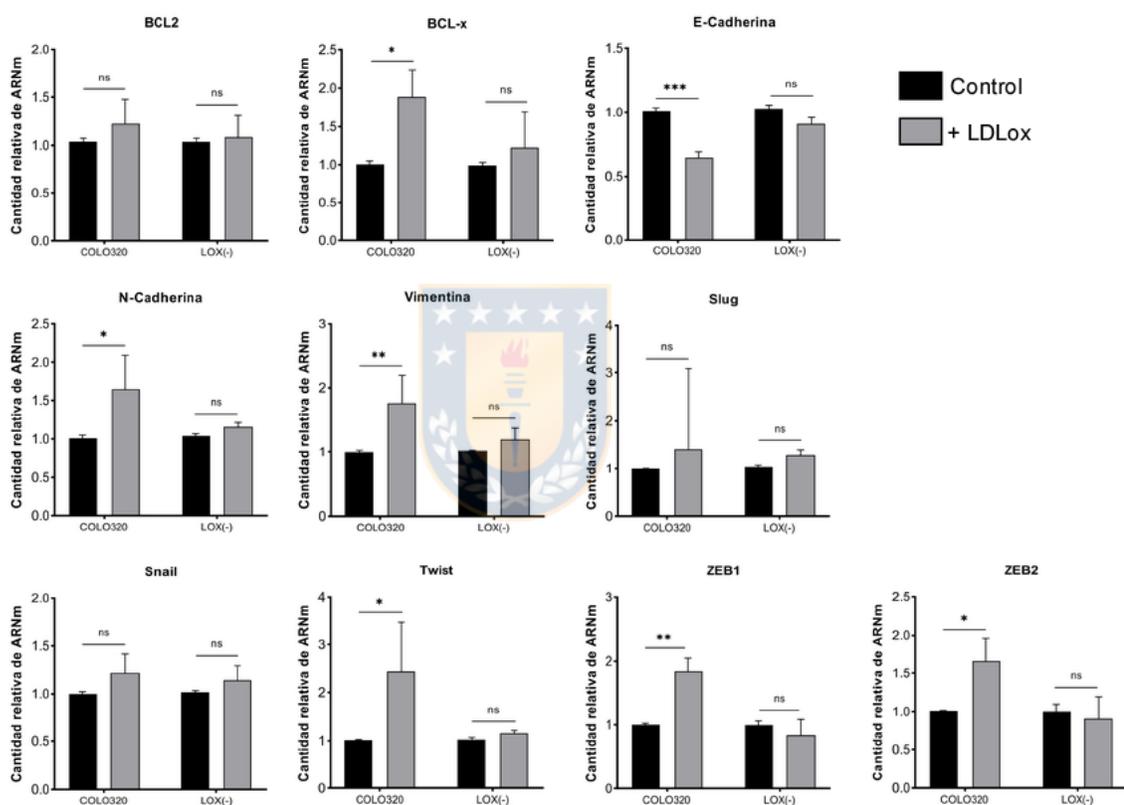


Figura 29: Niveles de expresión relativos de marcadores de TEM en las células de CCR COLO320 con expresión apagada del receptor y tratadas con LDLox. Expresión relativa del ARNm codificante para BCL2, BCL-x, E-Cadherina, N-Cadherina, Vimentina, Slug, Snail, Twist, ZEB1 y ZEB2 en células COLO320 y COLO-LOX(-). Las células se incubaron con 50 μ g/mL de LDLox por 24 h. Las cuantificaciones se realizaron a partir de ARN total por PCR en tiempo real y se utilizó como normalizador la expresión de β -actina. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. BCL2, BCL-x, E-Cadherina, N-Cadherina, Snail, ZEB1 y ZEB2: ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey. Vimentina, Slug y Twist: prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Fuente: elaboración propia.

5.13- La LDL oxidada modula la expresión de genes involucrados en migración, invasión y angiogénesis en células humanas de CCR

La actividad de las metaloproteasas de matriz extracelular es fundamental para los procesos de angiogénesis, migración e invasión. Para estudiar el efecto del TNF- α y la LDLox en marcadores asociados a estos procesos las células de CCR se incubaron con las concentraciones seleccionadas y se analizó la expresión de ARNm por RT-PCR cuantitativo de MMP2, MMP7, MMP9 y VEGF.

En las células HCT116 no se detectó aumento significativo de la expresión de las metaloproteinasas en las condiciones ensayadas. La expresión del VEGF aumentó significativamente con 100 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox en 1,6 veces. El TNF- α y el cotratamiento no estimularon significativamente la expresión de este gen.

En las células COLO320, el tratamiento con LDLox y el cotratamiento indujeron un aumento significativo de MMP2 y MMP7. La expresión de MMP2 aumentó 1,4 y 1,2 veces, respectivamente; mientras que la expresión de MMP7 aumentó 2,3 y 1,9 veces, respectivamente. El TNF- α no indujo un aumento significativo de la expresión de MMP2 y MMP7 en estas células (Figura 30).

En las células COLO320, el tratamiento con LDLox indujo un aumento significativo del marcador angiogénico VEGF de 1,6 veces en comparación con las células no tratadas. Las condiciones de TNF- α y cotratamiento no incrementaron significativamente la expresión de este marcador (Figura 30). El cotratamiento con TNF- α y LDLox no indujo un aumento significativo de la

expresión de los genes analizados en comparación con la condición tratada con LDLox.

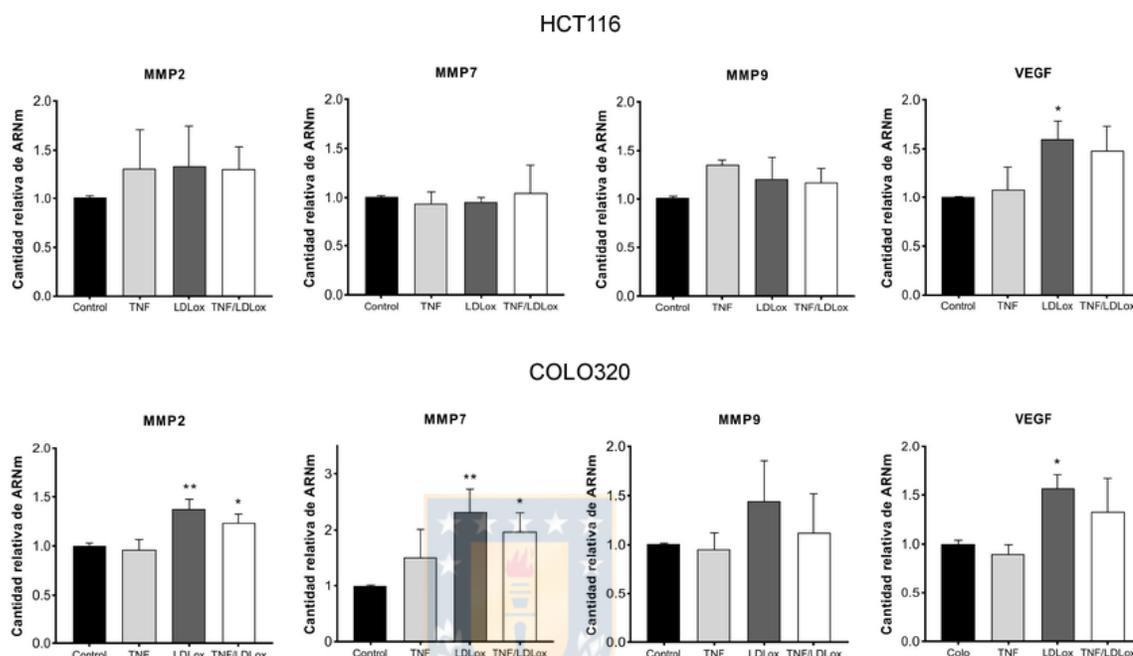


Figura 30: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular y VEGF en las células HCT116 y COLO320. Expresión relativa del ARNm codificante para MMP2, MMP7, MMP9 y VEGF en células HCT116 y COLO320. Las células se incubaron por 12 h con 10 ng/mL de TNF- α (grupos TNF y TNF/LDLox) o medio de cultivo (grupos control y LDLox); posteriormente se incubaron por 24 h con 50 y 100 μ g/mL de LDLox (grupos LDLox y TNF/LDLox) para las células COLO320 y HCT116, respectivamente. Las cuantificaciones se realizaron a partir de ARN total por PCR en tiempo real y se utilizó como normalizador la expresión de β -actina. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0,05$ vs control, ** $p < 0,01$ vs control. Fuente: elaboración propia.

Adicionalmente, la expresión de MMP2, MMP9 y VEGF se analizó por Western blot. En las células HCT116 los tratamientos con 50 y 100 μ g/mL de LDLox y los cotratamientos indujeron un aumento significativo de la expresión de VEGF respecto a las células no tratadas de 1,8; 1,7; 1,6 y 1,9 veces, respectivamente. El tratamiento con TNF- α no indujo un aumento significativo de la expresión de

VEGF. La expresión de MMP2 no varió en estas células con las distintas condiciones ensayadas (Figura 31).

En las células COLO320 el tratamiento con 50 µg/mL de LDLox indujo un aumento significativo de la expresión de VEGF de 1,7 veces respecto a las células no tratadas. El tratamiento con TNF-α y los contratamientos no estimularon significativamente la expresión de VEGF (Figura 31).

La expresión de MMP2 aumentó significativamente en las células estimuladas con TNF-α, con 25 y 50 µg/mL de LDLox y en el cotratamiento con la mayor concentración de LDLox empleada en 1,8; 2,0; 2,2 y 1,9 veces, respectivamente, respecto a las células no tratadas (Figura 31). Los cotratamientos con TNF-α y LDLox no estimularon significativamente la expresión de los genes analizados en comparación con las condiciones tratadas con LDLox. En ambas líneas celulares no se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de MMP9 en las condiciones ensayadas (datos no mostrados).

La actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 se analizó mediante zimografía. En las células HCT116 no se detectó un aumento significativo de la actividad proteolítica de MMP2 y MMP9 en las condiciones estudiadas. En las células COLO320, el tratamiento con 50 µg/mL de LDLox y el cotratamiento estimularon de manera significativa la actividad gelatinasa de ambas metaloproteasas en comparación con las células control. El tratamiento con TNF-α no incrementó significativamente la actividad proteolítica de estas proteínas (Figura 32).

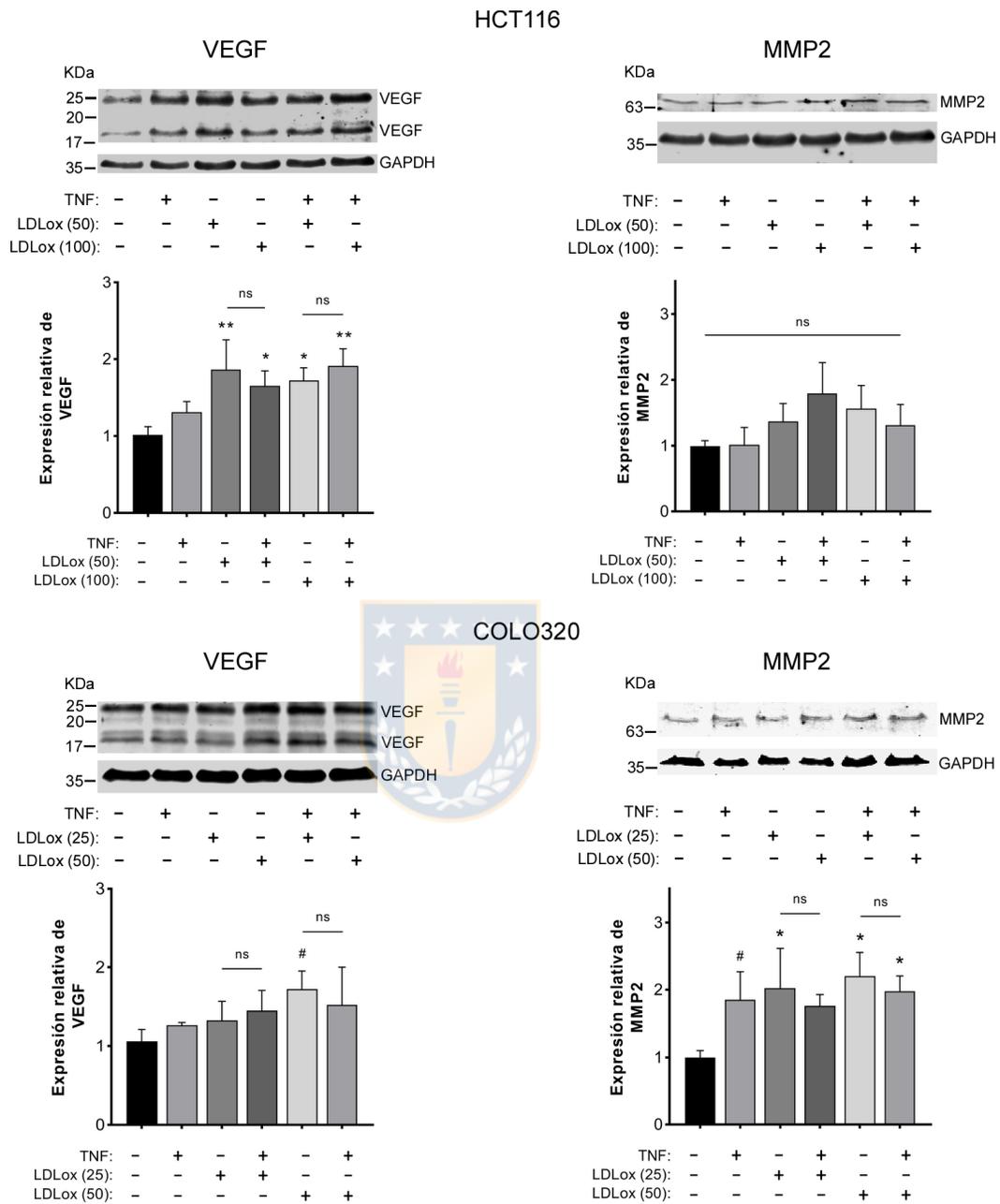


Figura 31: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la expresión de MMP2 y VEGF en células HCT116 y COLO320. Las células se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α por 12 h, posteriormente se trataron por 48 h con 50 y 100 μ g/mL de LDLox para las células HCT116 y con 25 y 50 μ g/mL de LDLox para las células COLO320. La expresión de la proteína GAPDH se utilizó como control de carga. Las barras representan la media \pm SD, n=3. (*) ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,01$ vs control. (#) ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunnett, # $p < 0,05$. Nota: el orden de aplicación en el gel difiere del orden graficado. Fuente: elaboración propia.

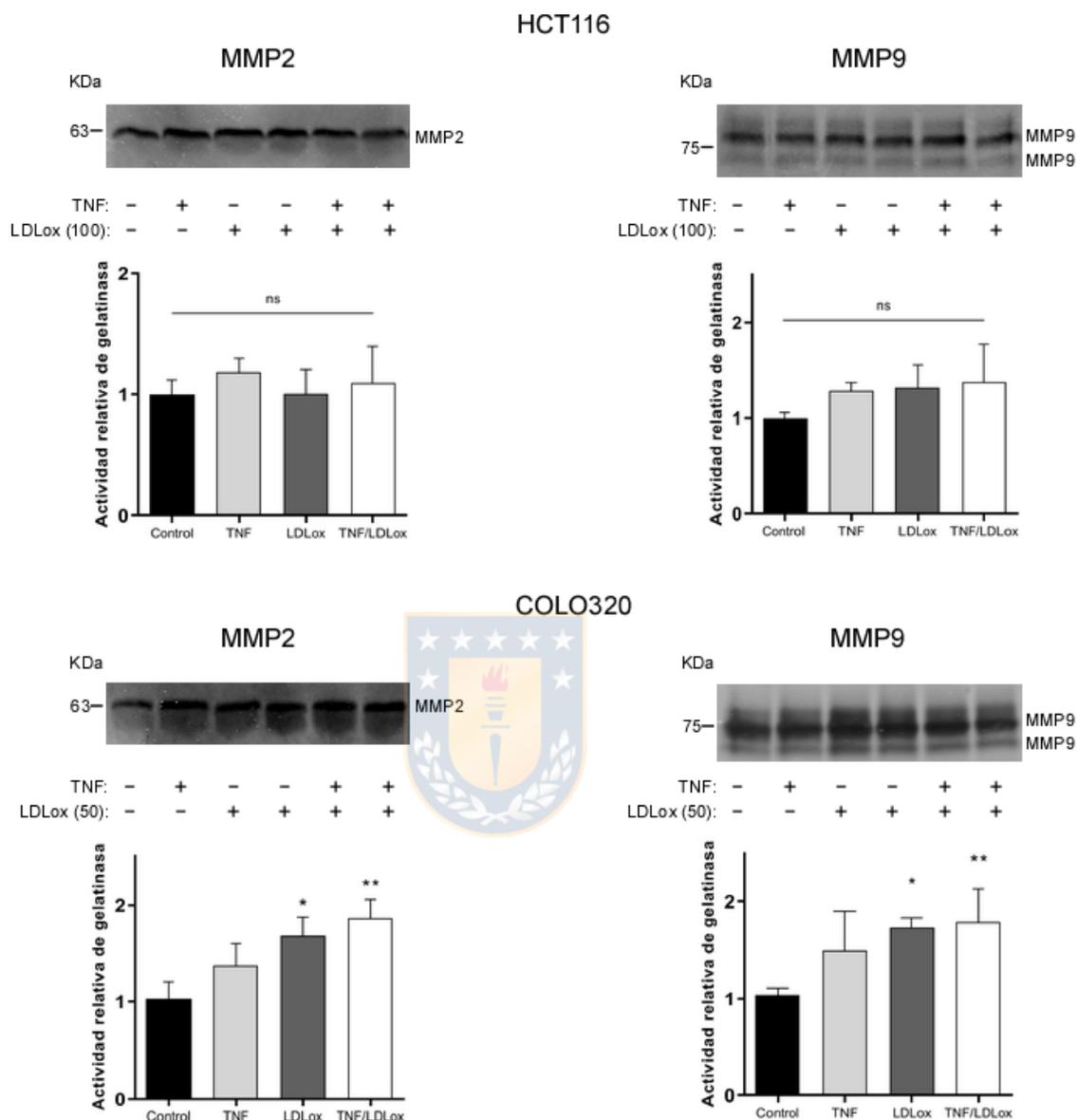


Figura 32: Efecto del TNF- α y la LDLox sobre la actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 en células HCT116 y COLO320. Las células se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α por 12 h, posteriormente se trataron por 48 h con 100 y 50 μ g/mL de LDLox para las células HCT116 y COLO320, respectivamente. Los sobrenadantes de los cultivos se concentraron para analizar la actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 por zimografía. Los tratamientos con LDLox y los cotratamientos se analizaron por duplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * p<0,05 vs control, ** p<0,01 vs control. Fuente: elaboración propia.

5.14- Las variaciones inducidas por la LDL oxidada sobre la expresión de genes involucrados en migración, invasión y angiogénesis en las células HCT116 y COLO320 son mediadas por el receptor LOX-1

Para determinar si los efectos detectados en los niveles de expresión del ARNm de MMP2, MMP7, MMP9 y VEGF inducidos por la LDLox dependen del receptor LOX-1 se incubaron las células HCT-LOX(-) y COLO-LOX(-) con la lipoproteína modificada. La expresión del ARNm de estos marcadores se analizó por RT-PCR cuantitativo y los resultados se compararon con las células parentales con expresión basal del receptor LOX-1.

Los tratamientos con LDLox en las células con expresión disminuida del receptor LOX-1 no indujeron cambios significativos en la expresión del ARNm de los marcadores estudiados. Para todos los genes que se analizaron y que anteriormente se había detectado un aumento significativo en los niveles de expresión de ARNm en las células HCT116 y COLO320 tratadas con LDLox el cambio se mantuvo (Figura 33).

5.15- La LDL oxidada estimula la migración de las células HCT116 y COLO320

El efecto del TNF- α , la LDLox y el cotratamiento sobre la migración de las líneas celulares COLO320 y HCT116 se analizó mediante un ensayo de migración por transwells. Se observó que el tratamiento con la citoquina indujo un aumento significativo en la migración de las células HCT116 y COLO320 de 2,2 y 3,4 veces

respecto al control, respectivamente (Figura 34). El tratamiento con LDLox indujo un aumento significativo de la migración de las células HCT116 y COLO320 de 5,0 y 3,3 veces respecto al control, respectivamente. El cotratamiento también indujo un aumento significativo de la migración de las células HCT116 y COLO320 de 4,8 y 2,6 veces respecto al control, respectivamente. En ambas líneas celulares el cotratamiento con TNF- α y LDLox no indujo un aumento significativo de la migración en comparación con la condición tratada con LDLox (Figura 34).

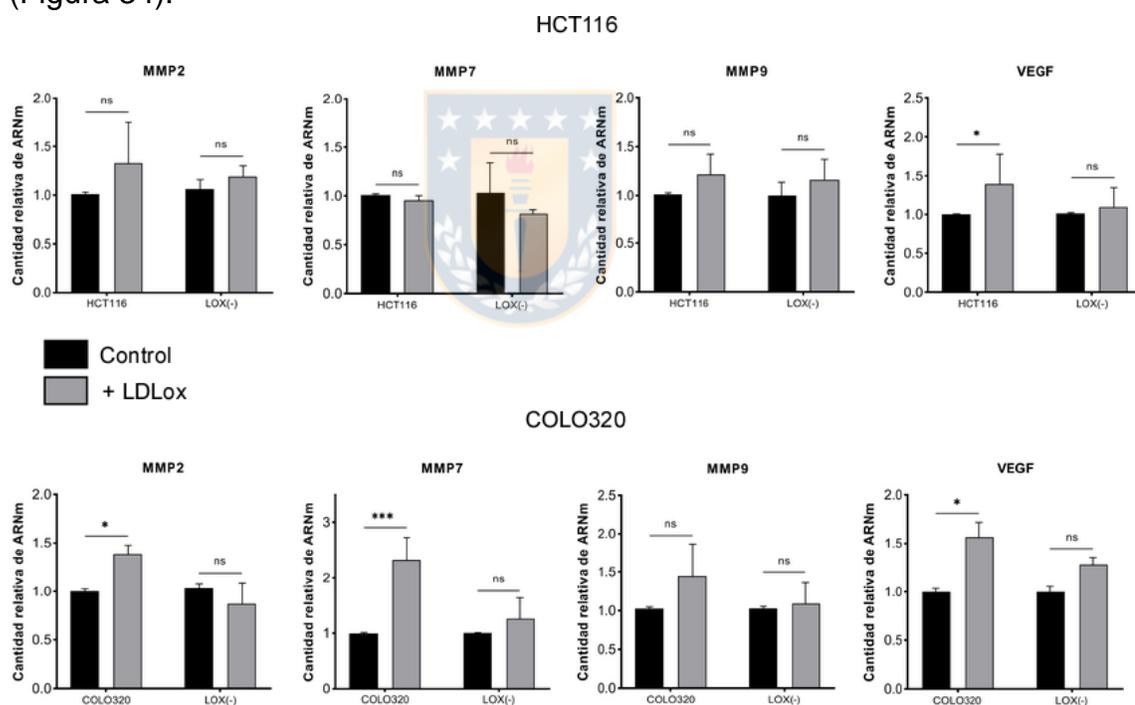


Figura 33: Niveles de expresión relativos de metaloproteinasas de matriz extracelular y VEGF en células de CCR con expresión apagada del receptor y tratadas con LDLox. Expresión relativa del ARNm codificante para MMP2, MMP7, MMP9 y VEGF en células HCT116, HCT-LOX(-), COLO320 y COLO-LOX(-). Las células HCT116 y HCT-LOX(-) se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox, mientras que las células COLO320 y COLO-LOX(-) se incubaron con 50 de $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox por 24 h. Las cuantificaciones se realizaron a partir de ARN total por PCR en tiempo real y se utilizó como normalizador la expresión de β -actina. Cada condición se analizó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, $n=3$. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Fuente: elaboración propia.

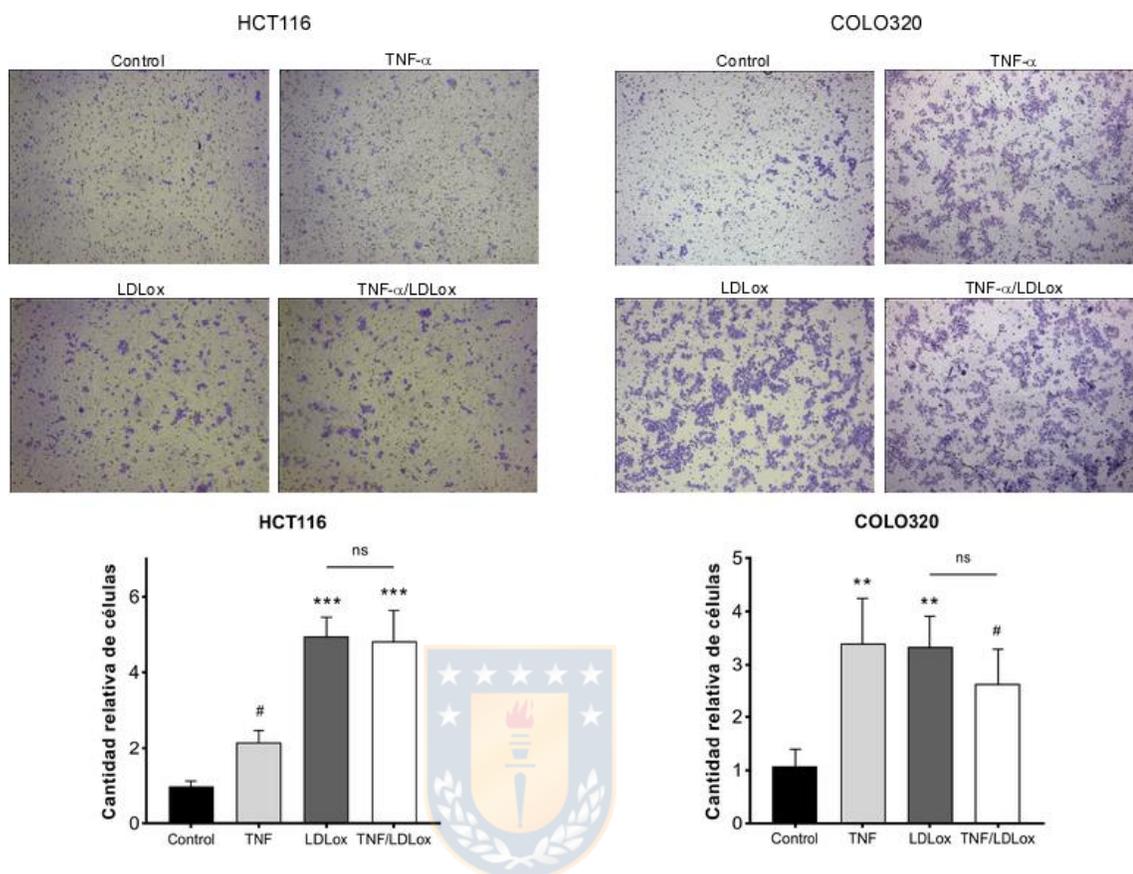


Figura 34: Efecto del TNF- α , LDLox y cotratamiento sobre la migración de las células HCT116 y COLO320. Las células se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α por 12 h, posteriormente se trataron por 48 h con 100 y 50 μ g/mL de LDLox para las células HCT116 y COLO320, respectivamente. Las células se contaron, se colocaron en la cámara superior de *transwells* de 8 μ m y se cultivaron por 24 h. Las células que migraron se tiñeron con violeta cristal al 0,5 %, se tomaron seis microfotografías para cada condición con un aumento de 10X y se contaron con el programa ImageJ. Las barras representan la media del número de células que migraron respecto al control \pm SD, n=3. (*) ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, ** p<0,01 vs control, *** p<0,001 vs control y TNF- α . (#) ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunnet, # p<0,05. Fuente: elaboración propia.

5.16- La LDL oxidada estimula la invasión de las células COLO320

El efecto del TNF- α , la LDLox y el cotratamiento sobre la invasión de las células COLO320 se analizó mediante *transwells* recubiertos con matrigel. El tratamiento con LDLox indujo un aumento significativo de la capacidad invasiva de las células

de 2,4 veces respecto al control. El contratamiento estimuló significativamente la cantidad de células que invadieron de 3,2 veces respecto al control. El TNF- α no estimuló la capacidad invasiva de las células. El cotratamiento con TNF- α y LDLox no indujo un aumento significativo del número de células que invadieron en comparación con la condición tratada con LDLox (Figura 35). Para las células HCT116 no se realizaron estos experimentos.

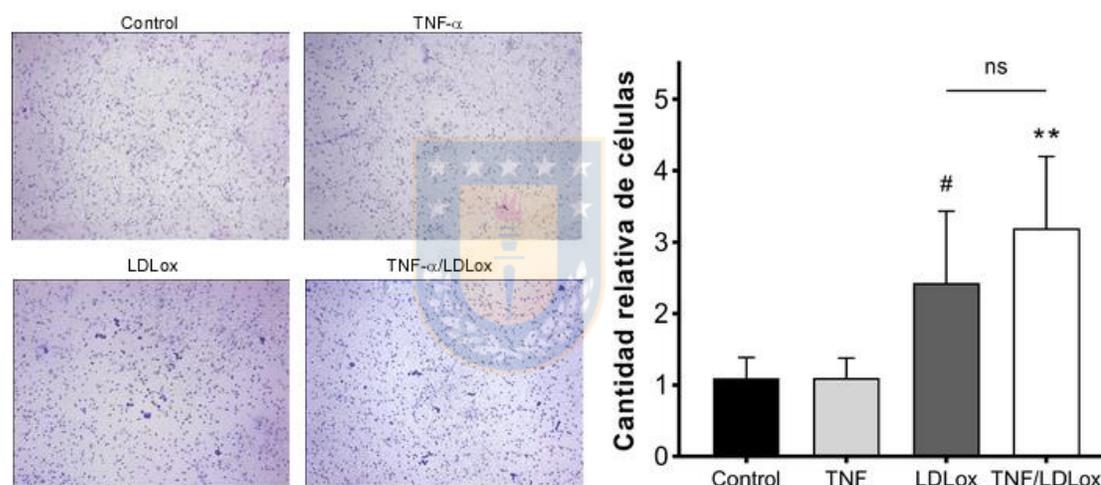


Figura 35: Efecto del TNF- α , LDLox y cotratamiento sobre la invasión de las células COLO320. Las células se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α por 12 h, posteriormente se trataron por 48 h con 50 μ g/mL de LDLox. Las células se contaron, se colocaron en la cámara superior de *transwells* de 8 μ m recubiertos con matrigel y se cultivaron por 48 h. Las células que migraron se tiñeron con violeta cristal al 0,5 %, se tomaron seis microfotografías para cada condición con un aumento de 10X y se contaron con el programa ImageJ. Las barras representan la media del número de células que invadieron respecto al control \pm SD, n=3. (*) ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, ** p<0,01 vs control y TNF- α . (#) ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Dunnet, # p<0,05. Fuente: elaboración propia.

5.17- La LDL oxidada estimula el crecimiento de organoides humanos de mucosa colónica normal

Analizamos la respuesta de los organoides humanos de mucosa colónica normal a concentraciones crecientes de LDLox. Las criptas de colon ascendente se aislaron, se sembraron en matrigel y se adicionaron concentraciones crecientes de LDox. En el día 6 de cultivo se obtuvieron imágenes de toda la gota de matrigel (Figura 36A y Anexo 6).

La LDLox estimuló el crecimiento de los colonoides humanos ya que el crecimiento de los organoides, cuantificado por el área de superficie de estas estructuras, aumentó de manera significativa cuando se incubaron en un rango de concentraciones de LDLox entre 20 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 36B). Además, la viabilidad de los colonoides fue significativamente mayor cuando se incubaron con 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox en comparación con los colonoides no estimulados con LDLox (Figura 36C).

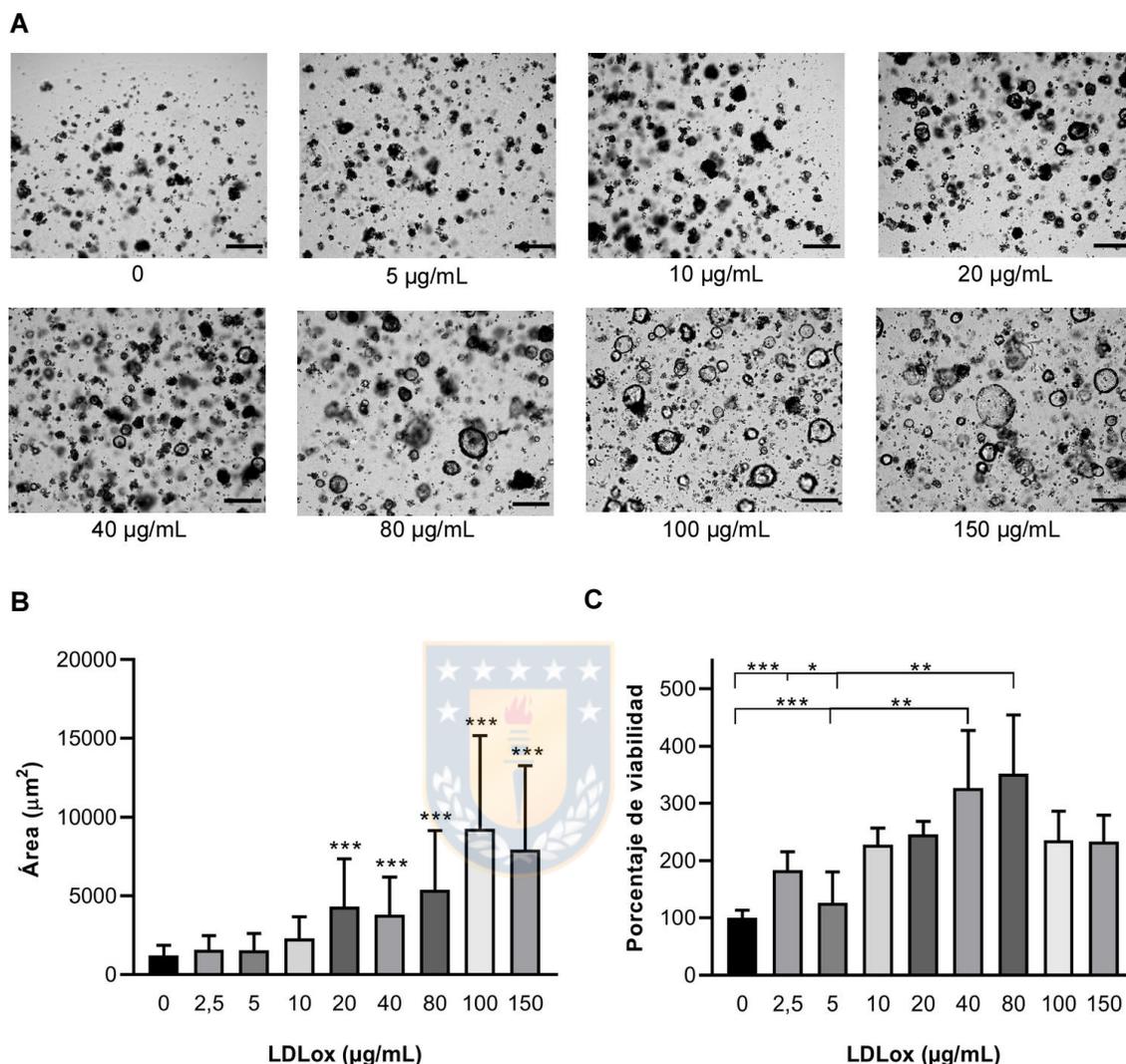


Figura 36: Crecimiento de organoides de colon humano tratados con concentraciones crecientes de LDLox. Los organoides de colon humano se sembraron por 2 días en matrigel y se estimularon con las concentraciones indicadas de LDLox por 4 días. **A)** Microfotografías de contraste de los organoides, aumento 4x, barra de escala: 100 µm. **B)** Cuantificación del área de superficie de los organoides. Cada condición se analizó por duplicado. Las barras representan la media del área \pm SD, n=3. Prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn, *** p<0,001 vs 0; 2,5; 5 y 10 µg/mL de LDLox. **C)** La viabilidad de los organoides tratados con concentraciones crecientes de LDLox se evaluó por ensayo de MTT. Cada condición se analizó por duplicado. Las barras representan la media del porcentaje de viabilidad respecto al control sin tratamiento con LDLox \pm SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. *Fuente: elaboración propia.*

5.17.1- El crecimiento de organoides humanos inducidos por LDL oxidada es mediado parcialmente por la generación de especies reactivas del oxígeno

Los efectos de la activación del receptor LOX-1 por LDLox en diferentes tipos celulares son mediados por la formación de ROS^{21,55-57}. Para determinar si el crecimiento y la viabilidad de los colonoides humanos inducido por LDLox es mediado por la formación de ROS, los cultivos de colonoides se estimularon con 80 µg/mL de LDLox en presencia de VAS2870, un pan-inhibidor de la enzima NADPH oxidasa; ML171, un inhibidor de la enzima NOX1 y en presencia de N-acetilcisteína (NAC), un *scavenger* de ROS. En el día 6 de cultivo se obtuvieron imágenes de toda la gota de matrigel (Figura 37 y Anexo 7).

La inhibición de ROS disminuyó de manera significativa el crecimiento y la viabilidad de los colonoides humanos en comparación con los organoides estimulados con 80 µg/mL de LDLox (Figura 37 B y C). La inhibición del crecimiento de los organoides fue mayor en las muestras incubadas con NAC que con los inhibidores de las enzimas NADPH oxidasa VAS2870 y ML171.

El crecimiento de los organoides incubados con LDLox y NAC no difirió de los colonoides incubados solamente con NAC. Sin embargo, el crecimiento de los colonoides incubados con LDLox y los inhibidores de la NADPH oxidasa fue significativamente mayor que el crecimiento de los colonoides incubados solamente con los inhibidores (Figura 37B).

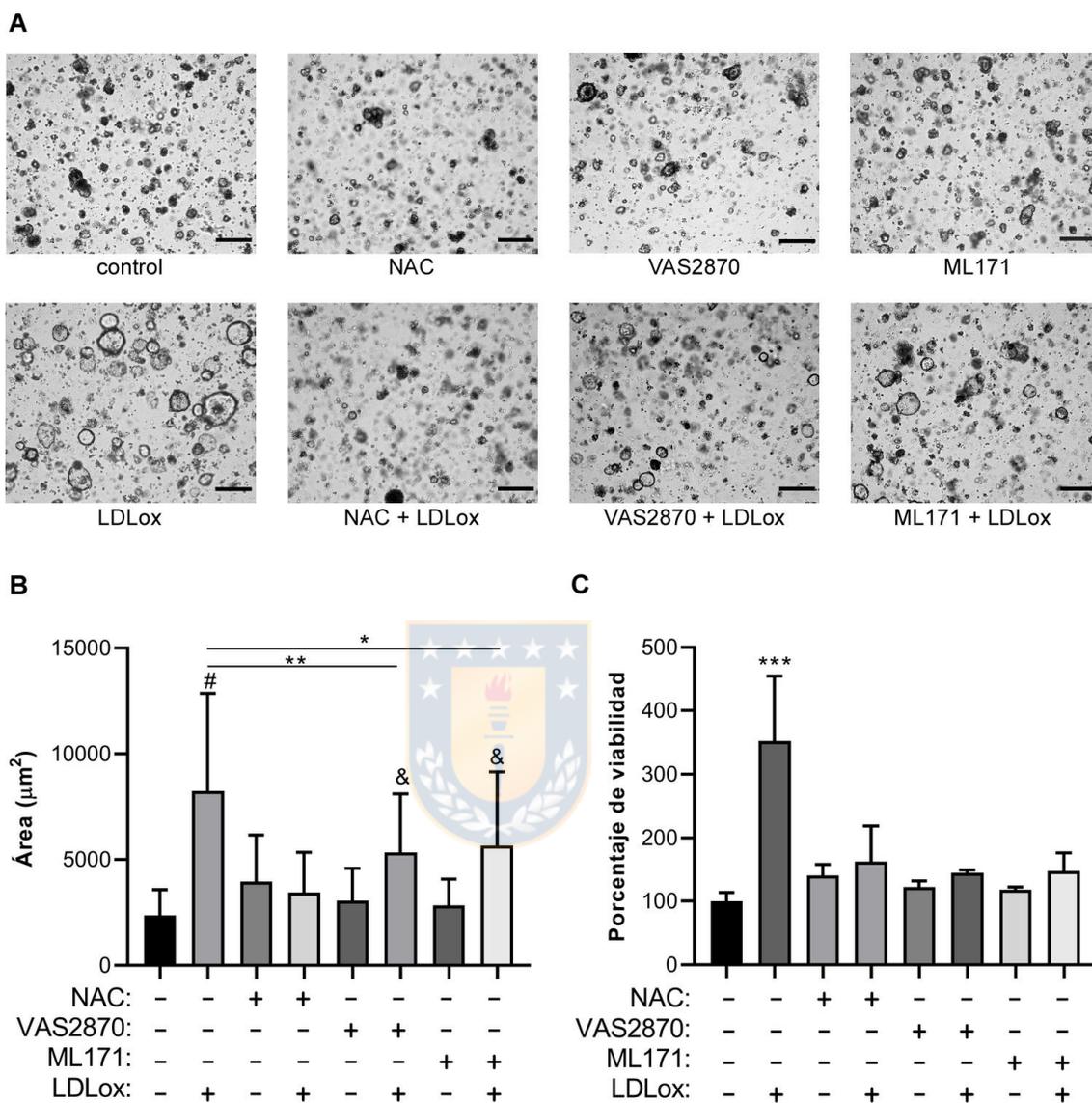


Figura 37: Crecimiento de organoides de colon humano tratados con LDLox e inhibidores de la formación de ROS. Los organoides de colon humano se incubaron con 80 µg/mL de LDLox con y sin 10 µM de VAS2870, 0,25 µM de ML171 y 2,5 mM de NAC por 4 días. **A)** Microfotografías de contraste de los organoides, aumento 4x, escala: 100 µm. **B)** Cuantificación del área de superficie de los organoides. Cada condición se analizó por duplicado. Las barras representan la media del área ± SD, n=3. Prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn, * p<0,05, ** p<0,01, # p<0,001 vs control, NAC, NAC+LDLox, ML171 y VAS, & p<0,001 vs control, VAS y ML171. **C)** Viabilidad de los organoides por ensayo de MTT. Cada condición se analizó por duplicado. Las barras representan la media del porcentaje de viabilidad respecto al control sin tratamiento con LDLox ± SD, n=3. ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey, *** p<0,001 vs todos los grupos. *Fuente: elaboración propia.*

6. DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias más frecuentes, ocupando el tercer lugar en incidencia a nivel mundial entre todos los tipos de cáncer. La obesidad, las dislipidemias y las enfermedades inflamatorias intestinales se han relacionado con el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer^{96,112,120}. Sin embargo, los mecanismos que relacionan estas condiciones clínicas con el CCR no se han dilucidado completamente, por lo que es importante investigar esta temática.

Las personas obesas tienen aumentados los niveles séricos de colesterol LDL, triglicéridos y mayor estrés oxidativo en comparación con individuos sanos, lo que favorece la conversión de LDL en LDLox^{161,162}. En realidad, las personas obesas, dislipidémicas o con EII tienen niveles de LDLox incrementados en comparación con personas sanas^{116,125,128}.

Por otro lado, el microambiente pro-oxidativo y pro-inflamatorio tumoral podría promover la modificación oxidativa de la LDL¹⁶³. Al mismo tiempo, la expresión y activación de enzimas que oxidan la LDL, ya sea por la formación de las ROS, como la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa, o por la modificación directa de los lípidos de la lipoproteína, como las lipooxigenasas y fosfolipasas, están aumentadas en el microambiente tumoral en el CCR¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. En varios estudios se asociaron los niveles elevados de la LDLox sérica con un mayor riesgo de desarrollar CCR^{115,117,118}.

El receptor LOX-1 reconoce e internaliza la LDLox y se ha estudiado en patologías como la aterosclerosis, el infarto agudo de miocardio, el síndrome metabólico, la obesidad y el cáncer^{32,45,168}. En resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo de investigación se identificó la expresión del receptor LOX-1 en células humanas de CCR, lo que fue confirmado por otro grupo de investigación⁴⁶.

El TNF- α , una citoquina pro-inflamatoria presente e incrementada en individuos obesos y en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales^{139,169}, también se ha identificado con funciones asociadas al desarrollo y progresión del CCR^{134,135}. La importancia de esta citoquina en las EII quedó demostrada por el éxito de la terapia con bloqueadores de TNF- α en el tratamiento de estas patologías, lo que se relaciona con la disminución de la incidencia de CCR en estos pacientes¹⁴⁴. Por otra parte, esta citoquina induce la expresión del receptor LOX-1 en diferentes tipos de células como macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas²²⁻²⁴.

La expresión del receptor LOX-1 en condiciones fisiológicas es baja, pero en condiciones fisiopatológicas como las descritas anteriormente, los niveles de expresión aumentan³². En un estudio realizado mediante inmunohistoquímica se detectó la sobreexpresión del receptor LOX-1 en muestras de tejido de CCR y sus niveles de expresión se relacionaron con el estadio tumoral, siendo mayores en estadios tumorales más avanzados⁴⁶. Es importante señalar que la expresión de LOX-1 se incrementó en la transición de un fenotipo normal del tejido colónico

a neoplásico, lo que sugiere una posible participación del receptor en las etapas tempranas de la progresión tumoral⁴⁶. Además, en este estudio se demostró que el silenciamiento del receptor LOX-1 moduló negativamente la proliferación y motilidad de las líneas celulares de CCR DLD1 y HCT8, aunque no evaluaron los efectos de su ligando, la LDL oxidada,⁴⁶.

El impacto de la activación del receptor LOX-1 por su ligando en la progresión tumoral de células de CCR no se ha reportado. Tampoco se han realizado estudios sobre la repercusión de un microambiente pro-inflamatorio en la expresión de este receptor o las consecuencias de su activación por la LDLox en células de CCR, bajo estas condiciones. En el presente trabajo analizamos los efectos del TNF- α y la LDLox sobre la expresión del receptor LOX-1, y a su vez, como su activación se relaciona con la progresión tumoral al estimular la proliferación celular, la expresión de marcadores de transición epitelio-mesenquimal y la migración e invasión de líneas celulares de CCR.

6.1- Expresión del receptor LOX-1 en cáncer colorrectal

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que LOX-1 se expresa en las líneas de CCR humanas HCT116 y COLO320. Además, detectamos que el ARNm de LOX-1 está sobreexpresado en adenocarcinomas y carcinomas de pacientes con CCR, en comparación con el tejido sano adyacente a los tumores, en estudios depositados en la base de datos Oncomine.

En este trabajo identificamos que el receptor LOX-1 se expresa en las líneas celulares de CCR, lo cual es congruente con lo reportado para otras líneas celulares de CCR y para células de cáncer de mama, prostático, gástrico, pulmonar y pancreático^{46-50,72}. Este resultado sugiere que la presencia del receptor LOX-1 en estas células podría mediar la internalización de LDLox y sus posibles efectos en la progresión tumoral. Una limitación de este estudio es la carencia de alguna línea celular de tejido colónico no tumoral para comparar la expresión del receptor LOX-1 entre estas células y la detectada en las líneas celulares de CCR.

Debido a que el TNF- α induce la expresión del receptor LOX-1 en diferentes tipos de células analizamos el efecto de concentraciones crecientes de esta citoquina en la expresión del receptor LOX-1 en las líneas celulares HCT116 y COLO320. En estos experimentos detectamos un aumento significativo de la expresión del receptor LOX-1 en las células HCT116 tratadas con 5, 10 y 20 ng/mL de TNF- α . En las células COLO320 el aumento significativo de la expresión del receptor LOX-1 se detectó en las células tratadas con 10 y 15 ng/mL de esta citoquina. Estos resultados son congruentes a los obtenidos en células THP1, células endoteliales humanas y células musculares lisas humanas, donde el tratamiento con varias concentraciones de TNF- α , en el rango entre 1,5 y 50 ng/mL, estimuló significativamente la expresión del receptor LOX-1^{19,22,24}. Para los experimentos de cotratamiento decidimos exponer las células a 10 ng/mL de TNF- α por ser esta la concentración que estimuló un aumento

significativo de la expresión del receptor LOX-1 en ambas líneas celulares en comparación con las células no tratadas.

La LDLox es el principal ligando de LOX-1 e induce un aumento de la expresión de este receptor en células endoteliales, macrófagos, células musculares lisas y líneas celulares de cáncer prostático^{19-21,49}. Sin embargo, en células de CCR no se ha descrito si la LDLox tiene un efecto similar sobre la expresión del receptor LOX-1. En este trabajo analizamos la expresión del receptor LOX-1 en dos líneas celulares de CCR tratadas con concentraciones crecientes de LDLox. En la línea celular COLO320 la expresión de LOX-1 aumentó significativamente con 25 y 50 µg/mL de LDLox, mientras que en las células HCT116 los niveles de expresión del receptor aumentaron con concentraciones de 50 y 100 µg/mL. Un efecto similar se observó en células de cáncer prostático donde la expresión del receptor LOX-1 mostró un patrón dependiente de la concentración de LDLox¹⁷⁰. Este efecto de la LDLox sobre la expresión de LOX-1 nos indica que se estaría activando un mecanismo de retroalimentación positiva de la expresión del receptor inducida por su propio ligando, mecanismo que se ha reportado en otros tipos celulares^{38,161}.

En ambas líneas celulares los tratamientos individuales con TNF-α y LDLox estimularon significativamente la expresión del receptor LOX-1. La estimulación combinada de las células de CCR con TNF-α y LDLox también incrementó la expresión del receptor LOX-1 en comparación con las células no tratadas, pero el efecto neto no fue aditivo. Es posible que no se haya detectado un efecto

aditivo en los niveles de expresión del receptor LOX-1 en la condición de cotratamiento porque se utilizaron las concentraciones máximas de TNF- α y LDLox que estimularon la expresión del receptor en ambas líneas celulares. La expresión del receptor LOX-1 es mediada por factores transcripcionales como NF- κ B y AP-1 que son activados por vías de señalización intracelular desencadenadas por la activación de los receptores del TNF- α y el receptor LOX-1^{132,171}. Los resultados de los experimentos de cotratamiento, son congruentes con el hecho de que la vía de regulación de la expresión del receptor LOX-1 por TNF- α y LDLox es compartida o redundante, lo que se ha demostrado en otros tipos de células^{133,161}. Un efecto aditivo del cotratamiento es probable que se observe con el uso de concentraciones menores de TNF- α y LDLox.

El aumento de la expresión de LOX-1 inducido por la LDLox en las células de CCR estudiadas dependió de la unión de LDLox al receptor. En las líneas celulares LOX(-) generadas mediante transducción lentiviral y que tienen disminuida la expresión del receptor LOX-1 no se observó un aumento de la expresión del receptor LOX-1 cuando estas células se trataron con la LDLox. Estos resultados sugieren que el receptor LOX-1 que se expresa en las líneas celulares de CCR es funcional y que media la internalización de la LDLox.

6.2- La LDL oxidada estimula la proliferación de células de cáncer colorrectal

En este trabajo analizamos la relevancia de la LDLox y el TNF- α en la viabilidad y proliferación de las células de CCR estudiadas. Determinamos que el tratamiento con TNF- α no generó cambios significativos sobre la viabilidad de las líneas celulares de CCR en el rango de concentraciones utilizadas (0-50 ng/mL), excepto con la mayor concentración de TNF- α empleada en las células HCT116 donde la viabilidad disminuyó en un 30 %.

Respecto a la repercusión de la LDLox en la viabilidad de las células de CCR detectamos una respuesta diferencial. Se observó un efecto citotóxico de la LDLox sobre la línea celular COLO320 con concentraciones iguales o mayores a 75 μ g/mL de la lipoproteína modificada, mientras que en las células HCT116 el efecto citotóxico de la LDLox se observó con la concentración mayor empleada de LDLox de 150 μ g/mL. Estos resultados son congruentes con otros reportados en otros tipos de cáncer donde la LDLox muestra un efecto citotóxico diferencial según el tipo celular^{172,173}.

Los estudios de proliferación se analizaron mediante ensayos de MTT y recuento celular con azul de tripán. En estos experimentos determinamos que la LDLox estimula la proliferación de las células HCT116 en rangos de concentración entre 6,5 y 50 μ g/mL, y que el efecto proliferativo se mantiene hasta las 96 h. Sin embargo, en las células COLO320 solamente observamos un

efecto proliferativo de la LDLox cuando las células se incubaron por 48 h. De manera general los resultados obtenidos en los ensayos de MTT y de recuento con azul de tripán son congruentes.

Los datos obtenidos son similares con lo reportado en la literatura, donde concentraciones moderadas o bajas de LDLox estimulan la proliferación celular, mientras que concentraciones elevadas tienen un efecto citotóxico o provocan arresto del ciclo celular. Por ejemplo, en las líneas de cáncer prostático LNCaP, DU-145 y C4-2 el tratamiento con LDLox estimula la proliferación celular en un rango de concentraciones entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁷⁰. Sin embargo, la LDLox a concentraciones de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibió significativamente la proliferación de células de leucemia K562/AO2 y de carcinoma esofágico EC-9706 en comparación con las células no tratadas¹⁷³. En células endoteliales de cordón umbilical la LDLox estimula la proliferación con concentraciones menores a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibiendo este proceso con concentraciones mayores¹⁷³. Además, esta lipoproteína modificada estimula el crecimiento de fibroblastos humanos a concentraciones entre 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^{42,174}. También se describió que en las células HT29 de CCR, OVCAR3 y OVCAR5 de cáncer de ovario y A549 de cáncer de pulmón, la LDLox no estimuló la proliferación y tuvo un efecto citotóxico en un rango de concentraciones mayor a los empleados en este estudio, que alcanzó hasta los 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la lipoproteína modificada¹⁷².

Una limitación de nuestro estudio es que no se analizó el efecto proliferativo de la LDL oxidada en las líneas celulares de CCR que tienen expresión reducida del

receptor LOX-1, por lo que no demostramos que este efecto es mediado por la activación del receptor. Por otra parte, como resultado de las modificaciones oxidativas de la LDL se generan moléculas biológicamente activas que podrían estimular la proliferación de las células tumorales independientemente de la activación del receptor LOX-1, como por ejemplo el ácido lisofosfatídico¹⁷⁵ por lo que resulta fundamental complementar este estudio con las líneas celulares con expresión disminuida del receptor LOX-1.

En ambas líneas celulares el tratamiento con TNF- α no indujo la proliferación de las células de CCR en ninguno de los tiempos analizados. Cuando las células se trataron con la citoquina y la mayor concentración de LDLox (50 μ g/mL) la proliferación celular disminuyó de manera significativa en comparación con las células tratadas con la LDLox. Tanto la LDLox como el TNF- α estimulan la formación de ROS intracelular por lo que consideramos que la inhibición de la proliferación en el cotratamiento se debe a un aumento del estrés oxidativo intracelular que la maquinaria antioxidante no contrarresta, provocando el arresto o muerte celular^{37,176}.

6.3- La LDLox induce la expresión de marcadores de transición epitelio mesenquimal y pro-angiogénicos en células humanas de cáncer colorrectal.

La TEM es un proceso complejo de transdiferenciación en el que las células con un fenotipo epitelial adquieren características de células mesenquimales. Este

proceso se distingue por la transición de la polaridad apical/basal típica de las células epiteliales a una polaridad delantera/trasera, la deconstrucción de las uniones intercelulares, la secreción de proteasas de matriz extracelular, la reprogramación de la expresión génica y la reorganización del citoesqueleto¹⁷⁷. La TEM permite que se incremente la malignidad en los tumores sólidos, aumentando la motilidad celular, su capacidad de invadir tejidos vecinos y la actividad metastásica.

En este trabajo evaluamos el efecto del TNF- α , la LDLox y los tratamientos combinados sobre marcadores de transición epitelio-mesenquimal y varios factores transcripcionales que regulan este proceso. Mediante ensayos de Western blot determinamos que la expresión de E-cadherina disminuyó significativamente en las células HCT116 tratadas con LDLox, mientras que la expresión de Vimentina aumentó. Sin embargo, en los tratamientos combinados estas variaciones no fueron significativas respecto al control. En las células COLO320, los tratamientos con LDLox estimularon la expresión de N-Cadherina y Vimentina, pero en los tratamientos combinados estas variaciones tampoco fueron significativas respecto al control. En los ensayos de estimulación con TNF- α , la expresión de estos marcadores en ambas líneas celulares se comportó con un patrón similar al descrito para la LDLox. Sin embargo, solamente el aumento de la expresión de Vimentina fue significativo en las células HCT116 tratadas con la citoquina en comparación al control.

En los ensayos de RT-PCR en tiempo real, la expresión del ARNm de E-cadherina disminuyó de manera significativa en las células HCT116 en las condiciones de LDLox y TNF/LDLox, sin embargo, mediante Western blot solamente detectamos una disminución significativa en las células estimuladas con LDLox. La expresión de Vimentina aumentó de manera significativa en las células estimuladas con LDLox y el cotratamiento y de manera similar solamente detectamos aumento significativo mediante Western blot para las células tratadas con LOX-1. Además, detectamos un aumento significativo de la expresión de N-Cadherina en las células tratadas con TNF- α y LDLox. De todos los factores transcripcionales evaluados, solamente detectamos un aumento significativo de la expresión del factor ZEB2 en la condición de LDLox.

En las células COLO320 detectamos un aumento significativo de los niveles de ARNm de Vimentina tanto en la condición tratada con LDLox como en el cotratamiento a diferencia de lo detectado por Western blot donde solamente detectamos aumento significativo en la condición de tratamiento con LDLox. De manera similar a lo observado mediante Western blot, la expresión de N-Cadherina aumentó de manera significativa en las células tratadas con LDLox. Además, detectamos una disminución significativa de la expresión del ARNm de E-Cadherina en las células tratadas con LDLox. En estas células detectamos un aumento significativo de la expresión de los factores transcripcionales Twist y ZEB2 en la condición de LDLox.

En ambas líneas celulares, y para todos los genes analizados, no detectamos un aumento significativo de la expresión en la condición de cotratamiento al comparar con los tratamientos individuales. Estos resultados sugieren que el tratamiento combinado TNF/LDLox no tiene un efecto aditivo en los procesos relacionados a la TEM en las dos líneas celulares de cáncer colorrectal en estudio.

Cuando realizamos los experimentos de expresión utilizando modelos celulares LOX(-) determinamos que los efectos de la LDLox sobre la inducción de la EMT son prevenidos en las dos líneas celulares estudiadas. Además, en estos experimentos detectamos un aumento significativo de la expresión de Twist en las células HCT116 y de ZEB1 en las células COLO320. Este resultado sugiere que la LDLox al interactuar con el receptor LOX-1 promueve la TEM en estas células.

Resulta interesante que las células tratadas con TNF- α por lo general no indujeron modificaciones significativas de la expresión de estos marcadores de TEM, pues al menos para las células HCT116, se ha reportado por varios grupos de investigación que esta citoquina induce la TEM. Sin embargo, debemos destacar que la concentración de TNF- α empleada en esos estudios fue 2 y 10 veces mayor a la empleada en este trabajo^{178,179}.

En este estudio analizamos la expresión de marcadores pro-angiogénicos, específicamente las proteasas de matriz extracelular MMP2, MMP7, MMP9 y el

VEGF. Además, las metaloproteinasas de matriz son indispensables en el proceso de invasión celular ya que al degradar la membrana basal y el tejido conectivo facilitan la migración celular.

En nuestros ensayos, detectamos un aumento significativo de los niveles de ARNm de MMP2 y MMP7 en las células COLO320 tratadas con LDLox, así como en la condición de cotratamiento. A nivel de proteína se observó un resultado similar para MMP2. Este efecto de la LDLox sobre la expresión de MMP2 y MMP7 no se observó en las células HCT116. Respecto a los niveles de ARNm de MMP9, estos no aumentaron en las 2 líneas celulares en las condiciones ensayadas.

En ambas líneas celulares el tratamiento con LDLox indujo un aumento significativo de la expresión del VEGF tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína. La evidencia de estudios preclínicos y clínicos indica que el VEGF es el factor angiogénico predominante en el CCR humano y está asociado con la formación de metástasis y peor pronóstico de supervivencia¹⁸⁰. El gen VEGFA humano está organizado en 8 exones y se expresa como múltiples isoformas debido al corte y empalme diferencial de los exones. Las cuatro isoformas principales descritas son VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ con pesos moleculares de 17,2, 22, 25,1 y 27 kDa, respectivamente¹⁸¹.

En particular, se ha detectado la sobreexpresión de la isoforma de VEGF₁₂₁ en muestras clínicas de cáncer colorrectal¹⁸². Esta isoforma tiene actividad

angiogénica y carece de los exones 6 y 7 responsables del dominio de unión a heparina, difundiendo libremente a través de la matriz extracelular por lo que se considera que su expresión es determinante en la progresión tumoral. En ambas líneas celulares se detectó la expresión de varias isoformas de esta proteína, observándose mayores niveles de expresión de las isoformas VEGF₁₈₉ y VEGF₁₂₁.

Además, analizamos la actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 mediante zimografía. La actividad enzimática de MMP2 y MMP9 aumentó con el tratamiento con LDLox y el tratamiento combinado en las células COLO320, lo que podría favorecer la capacidad invasiva de esta línea celular. Sin embargo, a diferencia de la respuesta de COLO320 sobre la actividad de MMP9 y MMP2, ninguno de los tratamientos incrementó la actividad de metaloproteinasas de matriz en la línea celular HCT116.

En los experimentos de expresión génica se observó una marcada diferencia en la expresión de los distintos genes evaluados cuando se compararon ambas líneas celulares. Consideramos que esta diferencia se pueda deber a las estirpes celulares que dieron origen a estas líneas celulares, así como al número de genes mutados que presentan. La línea celular HCT116 presenta inestabilidad de microsatélites y es CIMP positiva, con gran cantidad de mutaciones (más de 160 polimorfismos de un solo nucleótido no sinónimos o inserciones/deleciones en regiones exónicas) y ha sido clasificada como subtipo consenso molecular tipo 4¹⁸³. El CMS4 se caracteriza por presentar basalmente altos niveles de genes

asociados con un fenotipo mesenquimal y se distingue por la activación de transición epitelio-mesenquimal y vía del TGF- β ⁸⁷. Consideramos que esta es la razón fundamental que los niveles de expresión de los genes analizados en este trabajo no aumentaron de manera significativa en estas las células HCT116 en comparación con las células COLO320.

Por otra parte, en este mismo estudio, se evidenció que la línea celular COLO320 tiene un origen de estirpe celular neuroendocrina y que presenta estabilidad de microsatélites y CIMP negativa, con menos número de mutaciones (25 polimorfismos de un solo nucleótido no sinónimos o inserciones/delecciones en regiones exónicas)¹⁸³.

6.4- La LDLox induce la migración e invasión de células humanas de cáncer colorrectal.

La migración celular y la capacidad de invasión están estrechamente relacionadas con la metástasis del cáncer. Para analizar el efecto de la LDLox en estos procesos se hicieron ensayos funcionales de migración e invasión celular por *transwells*. En estos experimentos determinamos que los tres tratamientos analizados estimulan significativamente la migración celular en ambas líneas de CCR. Con respecto a la invasión, los tratamientos con LDLox y el cotratamiento estimularon la capacidad invasiva de las células COLO320.

En estos ensayos los tratamientos con TNF- α indujeron un aumento del número de células que migraron en ambas líneas celulares. Un resultado similar fue

previamente descrito en las células HCT116^{146,147}. Respecto a la LDLox, los datos obtenidos son congruentes a lo descrito en otras líneas celulares de cáncer de pulmón y de próstata donde se demuestra un aumento de la capacidad migratoria o invasiva de estas líneas celulares al activarse el receptor LOX-1^{66,72}.

6.5- La LDL oxidada estimula la proliferación de organoides de tejido de colon sano

En este trabajo analizamos el efecto de la LDLox sobre el crecimiento de organoides de tejido normal de colon obtenido de 1 paciente con colitis ulcerativa. Los organoides son estructuras multicelulares que se forman por la proliferación y diferenciación de las células pluripotentes presentes en tejidos cultivados en 3 dimensiones. Estas estructuras se forman al embeber las células pluripotentes en matriz extracelular junto con la adición de los factores de crecimiento necesarios para la división celular de las mismas¹⁸⁴. La importancia de los organoides radica en que en estas estructuras se forman todos los tipos celulares presentes en el órgano del cual provienen¹⁸⁴.

El tratamiento de los organoides con LDLox estimuló su crecimiento y viabilidad de forma dependiente a la concentración de LDLox empleada. Hasta donde conocemos, esta es la primera vez que se reporta que la LDLox estimula el crecimiento de colonoides humanos de tejido sano.

La activación del receptor LOX-1 induce la síntesis de ROS que a su vez estimulan la proliferación en algunos tipos celulares. Asimismo, en las células

epiteliales de colon se expresan las subunidades de la NAPH oxidasa NOX1, DUOX1 y DUOX2 y se ha demostrado que la formación de ROS por esta última enzima es determinante en la transformación oncogénica en modelos de ratones que expresan constitutivamente TLR4 activado¹⁸⁵. En este trabajo analizamos la función de las ROS en el crecimiento y viabilidad de los colonoides al inhibir su formación utilizando inhibidores de la NADPH oxidasa o con un *scavenger* químico de ROS. El uso de ML171, un inhibidor específico para NOX1 o de VAS2870, un pan-inhibidor de la familia enzimática, disminuyó de manera significativa el crecimiento de los organoides estimulados con 80 µg/mL de LDLox en comparación con el grupo tratado solamente con LDLox. Sin embargo, los organoides de los grupos tratados con LDLox y los inhibidores ML171 y VAS2870 crecieron de manera significativa en comparación con los organoides incubados solamente con los inhibidores. Por otra parte, cuando los organoides se incubaron con LDLox en presencia del *scavenger* químico de ROS se inhibió completamente el crecimiento de los colonoides. Este resultado sugiere que la formación de ROS en los organoides de colon no depende solamente de la de la NADPH oxidasa y que el tratamiento con LDLox estimula otras fuentes de formación de ROS intracelular. Sin embargo, no demostramos que el efecto de la LDLox sobre el crecimiento y la viabilidad de los organoides es mediado por la activación del receptor LOX-1. Los colonocitos tienen como principal fuente de energía los ácidos de grasos de cadena corta sintetizados por la microbiota intestinal, por lo que se podría suponer que el suministro exógeno de estas

moléculas presentes en la LDLox podría estimular el metabolismo celular y de esta forma favorecer el crecimiento de los organoides. Además, la LDLox presenta varios componentes que tienen actividad biológica y que se ha demostrado que pueden estimular otras vías de señalización intracelular a través de receptores como el receptor de activación de proliferación de peroxisoma y el receptor tipo Toll 4⁹.

Los experimentos con organoides tienen dos limitaciones que hay que considerar al interpretar estos resultados. En primer lugar, estos experimentos se realizaron con organoides provenientes de un mismo individuo, por lo que es necesario repetirlos con muestras procedentes de otras personas para que los resultados sean generalizables. En segundo lugar, estos experimentos se realizaron solamente con organoides obtenidos a partir de tejido sano ya que no tuvimos disponibilidad de tejido tumoral, por lo que se hace necesario analizar el efecto de la LDLox en el crecimiento de organoides procedentes de tejido tumoral.

6.6- Modelo propuesto de acción del receptor LOX-1 en la progresión de cáncer colorrectal

En resumen, nuestros resultados muestran que el receptor LOX-1 se encuentra expresado en líneas celulares de cáncer de colorrectal y en muestras de tejido tumoral de pacientes con CCR. Los resultados demuestran que el TNF- α y la LDLox inducen un aumento de la expresión del receptor LOX-1 en las líneas celulares de CCR. Los

resultados obtenidos muestran que la activación de LOX-1 por su ligando la LDLox promueve la progresión tumoral de células humanas de cáncer colorrectal mediante la estimulación de la proliferación celular y que la activación del receptor LOX-1 induce la expresión de genes involucrados en angiogénesis y transición epitelio-mesenquimal. Además, la activación del receptor favorece la migración y la invasión de células humanas de CCR (Figura 38).

De esta manera, nosotros proponemos que la estimulación de la progresión tumoral mediada por LOX-1 y LDLox podrían dar repuesta al riesgo de cáncer colorrectal en personas obesas o con enfermedades inflamatorias intestinales, y su posible asociación entre ellas. La comprensión de la función del receptor LOX-1 en células de cáncer colorrectal podrían ser de ayuda en la clínica de este cáncer ya que en muestras histológicas se ha observado una relación positiva entre los niveles de expresión de este receptor y el grado tumoral. Estudios futuros podrían establecer definitivamente la función de este receptor y su participación en los mecanismos involucrados en la progresión de los tumores colorrectales.

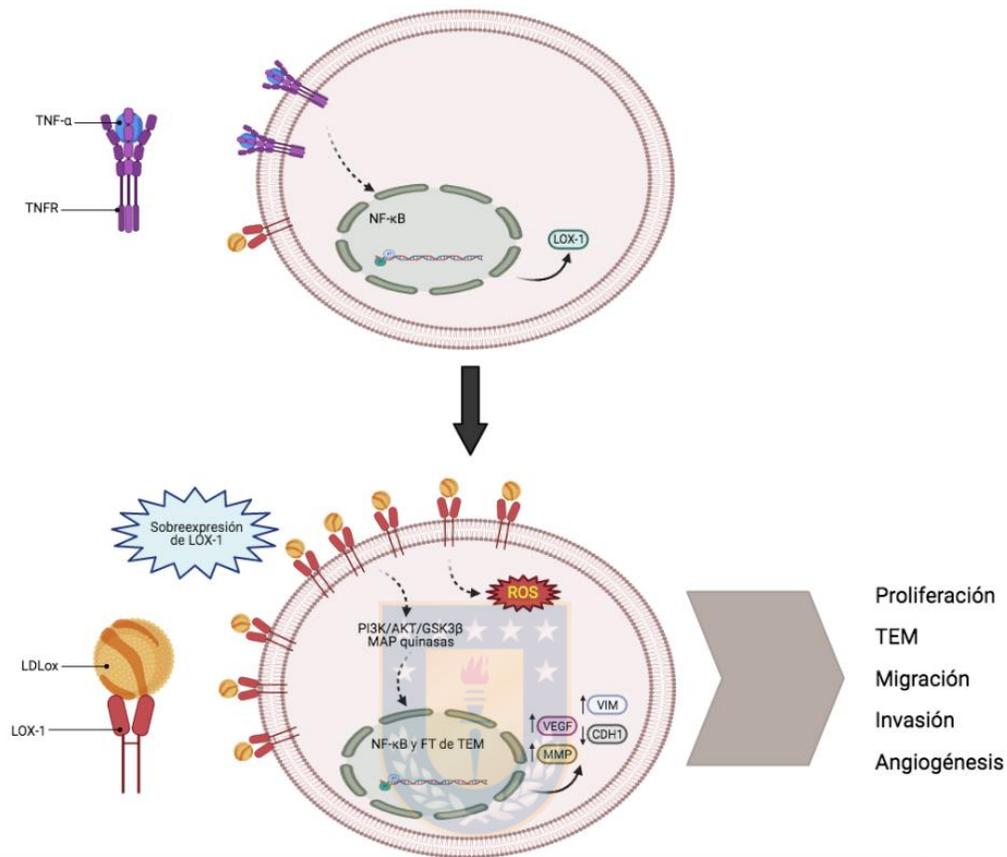


Figura 38: Esquema integrativo de la función propuesta del receptor LOX-1 en la progresión de cáncer colorrectal y su relación con TNF-α. La activación del receptor de TNF (TNFR) induce la expresión del receptor LOX-1. La unión de LDLox a LOX-1 aumenta la formación de ROS y la activación de vías de señalización intracelular como la PI3K/AKT/GSK3β y las MAP quinasas. La activación de estas vías da como resultado la activación de factores de transcripción (FT) asociados a la transición epitelial mesenquimal (FT-TEM) y de NF-κB. El resultado final es la expresión de genes involucrados en la proliferación celular, la angiogénesis, la transición epitelio mesenquimal, la migración y la invasión celular. *Fuente: elaboración propia, creado con BioRender.com.*

7. CONCLUSIONES

Nuestro trabajo presenta evidencias que asocian la activación del receptor LOX-1 por la LDLox con la progresión del cáncer colorrectal en los modelos celulares HCT116 y COLO320. Se demostró que LOX-1 se expresa basalmente en estas líneas celulares de cáncer colorrectal, y que se sobreexpresa cuando se estimulan las células con TNF- α y LDLox. Además, el cotratamiento con el TNF- α y la LDLox no muestran un efecto aditivo en la expresión del receptor LOX-1, en la proliferación celular y en procesos relacionados a la transición epitelio-mesenquimal, migración e invasión celular con las concentraciones empleadas.



En conclusión, la activación del receptor LOX-1 con su ligando la LDL oxidada promueve una reprogramación transcripcional que modula la expresión de marcadores de progresión tumoral en modelos celulares de cáncer colorrectal.

Adicionalmente, la expresión del receptor LOX-1 en células de cáncer colorrectal se incrementa frente a estímulos con moléculas pro-inflamatorias, como el TNF- α y la LDLox. Sin embargo, en los estudios realizados no se observó un efecto aditivo de estos estimuladores en la modulación de los marcadores de progresión tumoral.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Feingold KR y Grunfeld C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext. Edited by Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland HJ, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Singer F, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. 2000-2020.
- [2] Goldstein JL y Brown MS. (2009). The LDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(4), 431-8.
- [3] Fogelstrand P y Boren J. (2012). Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 22(1), 1-7.
- [4] Verges B. (2015). Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*, 58(5), 886-99.
- [5] Schulte DM, Paulsen K, Turk K, Brandt B, Freitag-Wolf S, Hagen I, Zeuner R, Schroder JO, Lieb W, Franke A, Nikolaus S, Mrowietz U, Gerdes S, Schreiber S, Laudes M. (2018). Small dense LDL cholesterol in human subjects with different chronic inflammatory diseases. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 28(11), 1100-5.
- [6] Klop B, Elte JW y Cabezas MC. (2013). Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 5(4), 1218-40.
- [7] Negre-Salvayre A, Auge N, Camare C, Bacchetti T, Ferretti G, Salvayre R. (2017). Dual signaling evoked by oxidized LDLs in vascular cells. *Free radical biology & medicine*, 106, 118-33.
- [8] Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. (2010). Oxidized low-density lipoprotein. *Methods in molecular biology*, 610, 403-17.
- [9] Levitan I, Volkov S y Subbaiah PV. (2010). Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxidants & redox signaling*, 13(1), 39-75.
- [10] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 386(6620), 73-7.
- [11] Tian K, Ogura S, Little PJ, Xu SW, Sawamura T. (2019). Targeting LOX-1 in atherosclerosis and vasculopathy: current knowledge and future perspectives. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1443(1), 34-53.

- [12] Ohki I, Ishigaki T, Oyama T, Matsunaga S, Xie Q, Ohnishi-Kameyama M, Murata T, Tsuchiya D, Machida S, Morikawa K, Tate S. (2005). Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL. *Structure*, 13(6), 905-17.
- [13] Shi X, Niimi S, Ohtani T, Machida S. (2001). Characterization of residues and sequences of the carbohydrate recognition domain required for cell surface localization and ligand binding of human lectin-like oxidized LDL receptor. *Journal of cell science*, 114(Pt 7), 1273-82.
- [14] Xie Q, Matsunaga S, Niimi S, Ogawa S, Tokuyasu K, Sakakibara Y, Machida S. (2004). Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells. *DNA Cell Biol*, 23(2), 111-7.
- [15] Ohki I, Amida H, Yamada R, Sugihara M, Ishigaki T, Tate S. (2011). Surface plasmon resonance study on functional significance of clustered organization of lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *Biochimica et biophysica acta*, 1814(2), 345-54.
- [16] Matsunaga S, Xie Q, Kumano M, Niimi S, Sekizawa K, Sakakibara Y, Komba S, Machida S. (2007). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) functions as an oligomer and oligomerization is dependent on receptor density. *Exp Cell Res*, 313(6), 1203-14.
- [17] Matarazzo S, Quitadamo MC, Mango R, Ciccone S, Novelli G, Biocca S. (2012). Cholesterol-lowering drugs inhibit lectin-like oxidized low-density lipoprotein-1 receptor function by membrane raft disruption. *Mol Pharmacol*, 82(2), 246-54.
- [18] Kumano-Kuramochi M, Xie Q, Kajiwara S, Komba S, Minowa T, Machida S. (2013). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is palmitoylated and internalizes ligands via caveolae/raft-dependent endocytosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 434(3), 594-9.
- [19] Arjuman A y Chandra NC. (2015). Differential pro-inflammatory responses of TNF-alpha receptors (TNFR1 and TNFR2) on LOX-1 signalling. *Molecular biology reports*, 42(6), 1039-47.
- [20] Zhang Z, Zhang D, Du B, Chen Z. (2017). Hyperoside inhibits the effects induced by oxidized low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells via oxLDL-LOX-1-ERK pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 433(1-2), 169-76.

- [21] Ou HC, Chou WC, Hung CH, Chu PM, Hsieh PL, Chan SH, Tsai KL. (2019). Galectin-3 aggravates ox-LDL-induced endothelial dysfunction through LOX-1 mediated signaling pathway. *Environ Toxicol*, 34(7), 825-35.
- [22] Liang M, Zhang P y Fu J. (2007). Up-regulation of LOX-1 expression by TNF-alpha promotes trans-endothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer letters*, 258(1), 31-7.
- [23] Alanne-Kinnunen M, Lappalainen J, Oorni K, Kovanen PT. (2014). Activated human mast cells induce LOX-1-specific scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *PLoS one*, 9(9), e108352.
- [24] Hofnagel O, Luechtenborg B, Stolle K, Lorkowski S, Eschert H, Plenz G, Robenek H. (2004). Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(10), 1789-95.
- [25] Liu H, Li Y, Lin N, Dong X, Li W, Deng Y, Ma L. (2020). Interleukin-1beta Promotes Ox-LDL Uptake by Human Glomerular Mesangial Cells via LOX-1. *Int J Med Sci*, 17(8), 1056-61.
- [26] Hossain E, Ota A, Karnan S, Takahashi M, Mannan SB, Konishi H, Hosokawa Y. (2015). Lipopolysaccharide augments the uptake of oxidized LDL by up-regulating lectin-like oxidized LDL receptor-1 in macrophages. *Molecular and cellular biochemistry*, 400(1-2), 29-40.
- [27] Morawietz H, Duerschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J. (2001). Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 284(4), 961-5.
- [28] Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J. (1999). Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, 100(9), 899-902.
- [29] Shiu SW, Wong Y y Tan KC. (2012). Effect of advanced glycation end products on lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 19(12), 1083-92.
- [30] Ghazi-Khanloosani M, Bandegi AR, Kokhaei P, Barati M, Pakdel A. (2019). CRP and LOX-1: a Mechanism for Increasing the Tumorigenic Potential of Colorectal Cancer Carcinoma Cell Line. *Pathol Oncol Res*, 25(4), 1467-75.

- [31] Nagase M, Abe J, Takahashi K, Ando J, Hirose S, Fujita T. (1998). Genomic organization and regulation of expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) gene. *The Journal of biological chemistry*, 273(50), 33702-7.
- [32] Akhmedov A, Sawamura T, Chen CH, Kraler S, Vdovenko D, Luscher TF. (2020). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a crucial driver of atherosclerotic cardiovascular disease. *European heart journal*.
- [33] Mitsuoka H, Kume N, Hayashida K, Inui-Hayashiada A, Aramaki Y, Toyohara M, Jinnai T, Nishi E, Kita T. (2009). Interleukin 18 stimulates release of soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1). *Atherosclerosis*, 202(1), 176-82.
- [34] Mentrup T, Theodorou K, Cabrera-Cabrera F, Helbig AO, Happ K, Gijbels M, Gradtke AC, Rabe B, Fukumori A, Steiner H, Tholey A, Fluhrer R, Donners M, Schroder B. (2019). Atherogenic LOX-1 signaling is controlled by SPPL2-mediated intramembrane proteolysis. *The Journal of experimental medicine*, 216(4), 807-30.
- [35] Li YB, Zhang QH, Chen Z, He ZJ, Yi GH. (2015). Oxidized low-density lipoprotein attenuated desmoglein 1 and desmocollin 2 expression via LOX-1/Ca(2+)/PKC-beta signal in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 468(1-2), 380-6.
- [36] Akhmedov A, Rozenberg I, Paneni F, Camici GG, Shi Y, Doerries C, Sledzinska A, Mocharla P, Breitenstein A, Lohmann C, Stein S, von Lukowicz T, Kurrer MO, Boren J, Becher B, Tanner FC, Landmesser U, Matter CM, Luscher TF. (2014). Endothelial overexpression of LOX-1 increases plaque formation and promotes atherosclerosis in vivo. *European heart journal*, 35(40), 2839-48.
- [37] Hofmann A, Brunssen C y Morawietz H. (2017). Contribution of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and LOX-1 modulating compounds to vascular diseases. *Vascular pharmacology*.
- [38] Chistiakov DA, Orekhov AN y Bobryshev YV. (2016). LOX-1-Mediated Effects on Vascular Cells in Atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem*, 38(5), 1851-9.
- [39] Parlato S, Romagnoli G, Spadaro F, Canini I, Sirabella P, Borghi P, Ramoni C, Fiesi I, Biocca S, Gabriele L, Belardelli F. (2010). LOX-1 as a natural IFN-alpha-mediated signal for apoptotic cell uptake and antigen presentation in dendritic cells. *Blood*, 115(8), 1554-63.
- [40] Condamine T, Dominguez GA, Youn JI, Kossenkov AV, Mony S, Alicea-Torres K, Tcyganov E, Hashimoto A, Nefedova Y, Lin C, Partlova S, Garfall A, Vogl DT, Xu X, Knight SC, Malietzis G, Lee GH, Eruslanov E, Albelda SM, Wang

X, Mehta JL, Bewtra M, Rustgi A, Hockstein N, Witt R, Masters G, Nam B, Smirnov D, Sepulveda MA, Gabrilovich DI. (2016). Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol*, 1(2).

[41] Chen M, Kakutani M, Naruko T, Ueda M, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T. (2001). Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(1), 153-8.

[42] Villa M, Cerda-Opazo P, Jimenez-Gallegos D, Garrido-Moreno V, Chiong M, Quest AF, Toledo J, Garcia L. (2020). Pro-fibrotic effect of oxidized LDL in cardiac myofibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 524(3), 696-701.

[43] Wang X, Khaidakov M, Ding Z, Mitra S, Lu J, Dai Y, Mehta JL. (2012). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and cardiac fibroblast growth. *Hypertension*, 60(6), 1437-42.

[44] Santiago-Fernandez C, Martin-Reyes F, Tome M, Ocana-Wilhelmi L, Rivas-Becerra J, Tatzber F, Pursch E, Tinahones FJ, Garcia-Fuentes E, Garrido-Sanchez L. (2020). Oxidized LDL Modify the Human Adipocyte Phenotype to an Insulin Resistant, Proinflammatory and Proapoptotic Profile. *Biomolecules*, 10(4).

[45] Hirsch HA, Iliopoulos D, Joshi A, Zhang Y, Jaeger SA, Bulyk M, Tschlis PN, 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), 348-61.

[46] 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), 14765-80.

[47] 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/GSK3beta activation. *Scientific reports*, 7, 45275.

[48] Zhang J, Zhang L, Li C, Yang C, Li L, Song S, Wu H, Liu F, Wang L, Gu J. (2018). LOX-1 is a poor prognostic indicator and induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis in pancreatic cancer patients. *Cell Oncol (Dordr)*, 41(1), 73-84.

- [49] Gonzalez-Chavarria I, Cerro RP, Parra NP, Sandoval FA, Zuniga FA, Omazabal VA, Lamperti LI, Jimenez SP, Fernandez EA, Gutierrez NA, Rodriguez FS, Onate SA, Sanchez O, Vera JC, Toledo JR. (2014). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is an enhancer of tumor angiogenesis in human prostate cancer cells. *PloS one*, 9(8), e106219.
- [50] Khaidakov M y Mehta JL. (2012). Oxidized LDL triggers pro-oncogenic signaling in human breast mammary epithelial cells partly via stimulation of MiR-21. *PloS one*, 7(10), e46973.
- [51] Yang G, Xiong G, Feng M, Zhao F, Qiu J, Liu Y, Cao Z, Wang H, Yang J, You L, Zheng L, Zhang T, Zhao Y. (2020). OLR1 Promotes Pancreatic Cancer Metastasis via Increased c-Myc Expression and Transcription of HMGA2. *Molecular cancer research : MCR*, 18(5), 685-97.
- [52] Li W, Zhi W, Zhao J, Yao Q, Liu F, Niu X. (2018). Cinnamaldehyde protects VSMCs against ox-LDL-induced proliferation and migration through S arrest and inhibition of p38, JNK/MAPKs and NF-kappaB. *Vascular pharmacology*, 108, 57-66.
- [53] Hong D, Bai YP, Gao HC, Wang X, Li LF, Zhang GG, Hu CP. (2014). Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis via the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway. *Atherosclerosis*, 235(2), 310-7.
- [54] Wang R, Ding G, Liang W, Chen C, Yang H. (2010). Role of LOX-1 and ROS in oxidized low-density lipoprotein induced epithelial-mesenchymal transition of NRK52E. *Lipids in health and disease*, 9, 120.
- [55] Dandapat A, Hu C, Sun L, Mehta JL. (2007). Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(11), 2435-42.
- [56] Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Inoue N, Kamioka M, Uekita H, Ohkawara H, Sakamoto T, Sakamoto N, Okamoto Y, Takuwa Y, Kakino A, Fujita Y, Tanaka T, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y. (2009). LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells. *Cardiovascular research*, 84(1), 127-36.
- [57] Gliozzi M, Scicchitano M, Bosco F, Musolino V, Carresi C, Scarano F, Maiuolo J, Nucera S, Maretta A, Paone S, Mollace R, Ruga S, Zito MC, Macri R, Oppedisano F, Palma E, Salvemini D, Muscoli C, Mollace V. (2019). Modulation of Nitric Oxide Synthases by Oxidized LDLs: Role in Vascular Inflammation and Atherosclerosis Development. *International journal of molecular sciences*, 20(13).

- [58] Zhu BB, Wang H, Chi YF, Wang YM, Yao XM, Liu S, Qiu H, Fang J, Yin PH, Zhang XM, Peng W. (2018). Protective effects of probucol on Ox-LDL-induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells via LOX1/ROS/MAPK signaling. *Molecular medicine reports*, 17(1), 1289-96.
- [59] Li H, Zhao Q, Chang L, Wei C, Bei H, Yin Y, Chen M, Wang H, Liang J, Wu Y. (2019). LncRNA MALAT1 modulates ox-LDL induced EndMT through the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Lipids in health and disease*, 18(1), 62.
- [60] Wang W, Wang D, Kong C, Li S, Xie L, Lin Z, Zheng Y, Zhou J, Han Y, Ji Y. (2019). eNOS S-nitrosylation mediated OxLDL-induced endothelial dysfunction via increasing the interaction of eNOS with betacatenin. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865(7), 1793-801.
- [61] Sun Y y Chen X. (2011). Ox-LDL-induced LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *Fundam Clin Pharmacol*, 25(5), 572-9.
- [62] Su Q, Sun Y, Ye Z, Yang H, Li L. (2018). Oxidized low density lipoprotein induces endothelial-to-mesenchymal transition by stabilizing Snail in human aortic endothelial cells. *Biomed Pharmacother*, 106, 1720-6.
- [63] Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Ranganathan S, Mehta JL. (2003). LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 107(4), 612-7.
- [64] Feng Y, Cai ZR, Tang Y, Hu G, Lu J, He D, Wang S. (2014). TLR4/NF-kappaB signaling pathway-mediated and oxLDL-induced up-regulation of LOX-1, MCP-1, and VCAM-1 expressions in human umbilical vein endothelial cells. *Genetics and molecular research : GMR*, 13(1), 680-95.
- [65] Honjo M, Nakamura K, Yamashiro K, Kiryu J, Tanihara H, McEvoy LM, Honda Y, Butcher EC, Masaki T, Sawamura T. (2003). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is a cell-adhesion molecule involved in endotoxin-induced inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 1274-9.
- [66] Gonzalez-Chavarria I, Fernandez E, Gutierrez N, Gonzalez-Horta EE, Sandoval F, Cifuentes P, Castillo C, Cerro R, Sanchez O, Toledo JR. (2018). LOX-1 activation by oxLDL triggers an epithelial mesenchymal transition and promotes tumorigenic potential in prostate cancer cells. *Cancer letters*, 414, 34-43.

- [67] Pucci S, Polidoro C, Greggi C, Amati F, Morini E, Murdocca M, Biancolella M, Orlandi A, Sangiuolo F, Novelli G. (2019). Pro-oncogenic action of LOX-1 and its splice variant LOX-1Delta4 in breast cancer phenotypes. *Cell Death Dis*, 10(2), 53.
- [68] 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. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(5), 3573-82.
- [69] Jiang L, Jiang S, Zhou W, Huang J, Lin Y, Long H, Luo Q. (2019). Oxidized low density lipoprotein receptor 1 promotes lung metastases of osteosarcomas through regulating the epithelial-mesenchymal transition. *J Transl Med*, 17(1), 369.
- [70] Nakashima-Nakasuga C, Hazama S, Suzuki N, Nakagami Y, Xu M, Yoshida S, Tomochika S, Fujiwara N, Matsukuma S, Matsui H, Tokumitsu Y, Kanekiyo S, Shindo Y, Maeda N, Tsunedomi R, Iida M, Takeda S, Yoshino S, Ueno T, Hamamoto Y, Ogihara H, Hoshii Y, Nagano H. (2020). Serum LOX-1 is a novel prognostic biomarker of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*, 25(7), 1308-17.
- [71] Na L, Bai Y, Sun Y, Wang Z, Wang W, Yuan L, Zhao C. (2020). Identification of 9-Core Immune-Related Genes in Bladder Urothelial Carcinoma Prognosis. *Frontiers in oncology*, 10, 1142.
- [72] Wang D, Cheng X, Li Y, Guo M, Zhao W, Qiu J, Zheng Y, Meng M, Ping X, Chen X, Wang S, Luo J, Luo Q, Ma X, Xu L. (2020). C/EBPdelta-Slug-Lox1 axis promotes metastasis of lung adenocarcinoma via oxLDL uptake. *Oncogene*, 39(4), 833-48.
- [73] Murdocca M, Capuano R, Pucci S, Cicconi R, Polidoro C, Catini A, Martinelli E, Paolesse R, Orlandi A, Mango R, Novelli G, Di Natale C, Sangiuolo F. (2019). Targeting LOX-1 Inhibits Colorectal Cancer Metastasis in an Animal Model. *Frontiers in oncology*, 9(927), 927.
- [74] Khaidakov M, Mitra S, Kang BY, Wang X, Kadlubar S, Novelli G, Raj V, Winters M, Carter WC, Mehta JL. (2011). Oxidized LDL receptor 1 (OLR1) as a possible link between obesity, dyslipidemia and cancer. *PLoS one*, 6(5), e20277.
- [75] The Global Cancer Observatory: GLOBOCAN. (2020). Colorectal cancer. Lyon, Francia. Recuperado en <https://gco.iarc.fr/today/home>. [diciembre, 2020].
- [76] Departamento de Estadística e Información de Salud. (2018). Serie de defunciones y mortalidad observada por Tumores Malignos, según grupos de

edad y sexo, 1997-2015. Santiago de Chile, Chile. Recuperado en <http://www.deis.cl/series-y-graficos-de-mortalidad/>. [julio, 2019].

[77] Tomasetti C y Vogelstein B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347(6217), 78-81.

[78] Castells A. (2016). Hereditary forms of colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol*, 39 Suppl 1, 62-7.

[79] Araghi M, Soerjomataram I, Bardot A, Ferlay J, Cabañero JC, Morrison DS, De P, Tervonen H, Walsh PM, Bucher O, Engholm G, Jackson C, McClure C, Woods RR, Saint-Jacques N, Morgan E, Ransom D, Thursfield V, Moller B, Leonfellner S, Guren MG, Bray F, Arnold M. (2019). Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 4(7), 511-8.

[80] Siegel RL, Torre LA, Soerjomataram I, Hayes RB, Bray F, Weber TK, Jemal A. (2019). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut*, 68(12), 2179-85.

[81] Liu PH, Wu K, Ng K, Zauber AG, Nguyen LH, Song M, He X, Fuchs CS, Ogino S, Willett WC, Chan AT, Giovannucci EL, Cao Y. (2019). Association of Obesity With Risk of Early-Onset Colorectal Cancer Among Women. *JAMA Oncol*, 5(1), 37-44.

[82] Fischer J, Walker LC, Robinson BA, Frizelle FA, Church JM, Eglinton TW. (2019). Clinical implications of the genetics of sporadic colorectal cancer. *ANZ J Surg*, 89(10), 1224-9.

[83] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. (2019). Colorectal cancer. *Lancet*, 394(10207), 1467-80.

[84] Nguyen HT y Duong HQ. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology letters*, 16(1), 9-18.

[85] Nguyen LH, Goel A y Chung DC. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291-302.

[86] Vacante M, Borzi AM, Basile F, Biondi A. (2018). Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World J Clin Cases*, 6(15), 869-81.

[87] Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon

IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa EMF, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*, 21(11), 1350-6.

[88] Włodarczyk M, Włodarczyk J, Siwinski P, Sobolewska-Włodarczyk A, Fichna J. (2018). Genetic Molecular Subtypes in Optimizing Personalized Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Curr Drug Targets*, 19(15), 1731-7.

[89] Mooi JK, Wirapati P, Asher R, Lee CK, Savas P, Price TJ, Townsend A, Hardingham J, Buchanan D, Williams D, Tejpar S, Mariadason JM, Tebbutt NC. (2018). The prognostic impact of consensus molecular subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 29(11), 2240-6.

[90] Sawayama H, Miyamoto Y, Ogawa K, Yoshida N, Baba H. (2020). Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification. *Ann Gastroenterol Surg*, 4(5), 528-39.

[91] Hanahan D y Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-74.

[92] Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*, 2014, 149185.

[93] Nasef NA y Mehta S. (2020). Role of Inflammation in Pathophysiology of Colonic Disease: An Update. *International journal of molecular sciences*, 21(13).

[94] Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 125(1), 171-80.

[95] Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, Qin H. (2013). Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PloS one*, 8(1), e53916.

[96] Fang X, Wei J, He X, Lian J, Han D, An P, Zhou T, Liu S, Wang F, Min J. (2018). Quantitative association between body mass index and the risk of cancer: A global Meta-analysis of prospective cohort studies. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 143(7), 1595-603.

- [97] Pearson-Stuttard J, Zhou B, Kontis V, Bentham J, Gunter MJ, Ezzati M. (2018). Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 6(6), e6-e15.
- [98] Unger C, Kramer N, Unterleuthner D, Scherzer M, Burian A, Rudisch A, Stadler M, Schleder M, Lenhardt D, Riedl A, Walter S, Wernitznig A, Kenner L, Hengstschlager M, Schuler J, Sommergruber W, Dolznig H. (2017). Stromal-derived IGF2 promotes colon cancer progression via paracrine and autocrine mechanisms. *Oncogene*, 36(38), 5341-55.
- [99] Yoon YS, Kwon AR, Lee YK, Oh SW. (2019). Circulating adipokines and risk of obesity related cancers: A systematic review and meta-analysis. *Obes Res Clin Pract*, 13(4), 329-39.
- [100] Kim S, Keku TO, Martin C, Galanko J, Woosley JT, Schroeder JC, Satia JA, Halabi S, Sandler RS. (2008). Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer research*, 68(1), 323-8.
- [101] Tarasiuk A, Mosinska P y Fichna J. (2018). The mechanisms linking obesity to colon cancer: An overview. *Obes Res Clin Pract*, 12(3), 251-9.
- [102] Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. (2016). Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annual review of pathology*, 11, 421-49.
- [103] Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell*, 15(2), 103-13.
- [104] Andrews C, McLean MH y Durum SK. (2018). Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Frontiers in immunology*, 9, 1270.
- [105] Hibiya S, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Horita N, Watanabe S, Shirasaki T, Nishimura R, Kimura N, Nishimura T, Gotoh N, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. (2017). Long-term Inflammation Transforms Intestinal Epithelial Cells of Colonic Organoids. *Journal of Crohn's & colitis*, 11(5), 621-30.
- [106] Wang Y, Kim R, Hwang SJ, Dutton J, Sims CE, Allbritton NL. (2018). Analysis of Interleukin 8 Secretion by a Stem-Cell-Derived Human-Intestinal-Epithelial-Monolayer Platform. *Anal Chem*, 90(19), 11523-30.
- [107] Myant KB, Cammareri P, McGhee EJ, Ridgway RA, Huels DJ, Cordero JB, Schwitalla S, Kalna G, Ogg EL, Athineos D, Timpson P, Vidal M, Murray GI, Greten FR, Anderson KI, Sansom OJ. (2013). ROS production and NF-kappaB

activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell*, 12(6), 761-73.

[108] Perez S, Talens-Visconti R, Rius-Perez S, Finamor I, Sastre J. (2017). Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free radical biology & medicine*, 104, 75-103.

[109] Mangerich A, Knutson CG, Parry NM, Muthupalani S, Ye W, Prestwich E, Cui L, McFaline JL, Mobley M, Ge Z, Taghizadeh K, Wishnok JS, Wogan GN, Fox JG, Tannenbaum SR, Dedon PC. (2012). Infection-induced colitis in mice causes dynamic and tissue-specific changes in stress response and DNA damage leading to colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(27), E1820-9.

[110] Frick A, Khare V, Paul G, Lang M, Ferik F, Knasmüller S, Beer A, Oberhuber G, Gasche C. (2018). Overt Increase of Oxidative Stress and DNA Damage in Murine and Human Colitis and Colitis-Associated Neoplasia. *Molecular cancer research : MCR*, 16(4), 634-42.

[111] Kay J, Thadhani E, Samson L, Engelward B. (2019). Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. *DNA Repair (Amst)*, 83, 102673.

[112] Yao X y Tian Z. (2015). Dyslipidemia and colorectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Cancer causes & control : CCC*, 26(2), 257-68.

[113] van Duynhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Calligaro M, Jenab M, Pischon T, Jansen EH, Frohlich J, Ayyobi A, Overvad K, Toft-Petersen AP, Tjønneland A, Hansen L, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Cottet V, Palli D, Tagliabue G, Panico S, Tumino R, Vineis P, Kaaks R, Teucher B, Boeing H, Drogan D, Trichopoulou A, Lagiou P, Dilis V, Peeters PH, Siersema PD, Rodriguez L, Gonzalez CA, Molina-Montes E, Dorransoro M, Tormo MJ, Barricarte A, Palmqvist R, Hallmans G, Khaw KT, Tsilidis KK, Crowe FL, Chajes V, Fedirko V, Rinaldi S, Norat T, Riboli E. (2011). Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Gut*, 60(8), 1094-102.

[114] Kelly AS, Jacobs DR, Jr., Sinaiko AR, Moran A, Steffen LM, Steinberger J. (2010). Relation of circulating oxidized LDL to obesity and insulin resistance in children. *Pediatr Diabetes*, 11(8), 552-5.

[115] Keshk WA, Zineldeen DH, Wasfy RE, El-Khadrawy OH. (2014). Fatty acid synthase/oxidized low-density lipoprotein as metabolic oncogenes linking obesity to colon cancer via NF-kappa B in Egyptians. *Medical oncology*, 31(10), 192.

- [116] Hurtado-Roca Y, Bueno H, Fernandez-Ortiz A, Ordoñas JM, Ibanez B, Fuster V, Rodríguez-Artalejo F, Laclaustra M. (2017). Oxidized LDL Is Associated With Metabolic Syndrome Traits Independently of Central Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, 66(2), 474-82.
- [117] Suzuki K, Ito Y, Wakai K, Kawado M, Hashimoto S, Toyoshima H, Kojima M, Tokudome S, Hayakawa N, Watanabe Y, Tamakoshi K, Suzuki S, Ozasa K, Tamakoshi A, Japan Collaborative Cohort Study G. (2004). Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: a case-control study nested in the Japan Collaborative Cohort Study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 13(11 Pt 1), 1781-7.
- [118] Crespo-Sanjuan J, Calvo-Nieves MD, Aguirre-Gervas B, Herreros-Rodríguez J, Velayos-Jimenez B, Castro-Alija MJ, Muñoz-Moreno MF, Sanchez D, Zamora-Gonzalez N, Bajo-Graneras R, Garcia-Centeno RM, Largo Cabrerizo ME, Bustamante MR, Garrote-Adrados JA. (2015). Early detection of high oxidative activity in patients with adenomatous intestinal polyps and colorectal adenocarcinoma: myeloperoxidase and oxidized low-density lipoprotein in serum as new markers of oxidative stress in colorectal cancer. *Lab Med*, 46(2), 123-35.
- [119] Diakowska D, Grabowski K, Nienartowicz M, Zarebski P, Fudalej K, Markocka-Maczka K. (2015). Circulating Oxidized Low-Density Lipoproteins and Antibodies against Oxidized Low-Density Lipoproteins as Potential Biomarkers of Colorectal Cancer. *Gastroenterology research and practice*, 2015, 146819.
- [120] Chandrasinghe P, Cereser B, Moorghen M, Al Bakir I, Tabassum N, Hart A, Stebbing J, Warusavitarne J. (2018). Role of SMAD proteins in colitis-associated cancer: from known to the unknown. *Oncogene*, 37(1), 1-7.
- [121] De Lerma Barbaro A, Perletti G, Bonapace IM, Monti E. (2014). Inflammatory cues acting on the adult intestinal stem cells and the early onset of cancer (review). *International journal of oncology*, 45(3), 959-68.
- [122] Yaeger R, Shah MA, Miller VA, Kelsen JR, Wang K, Heins ZJ, Ross JS, He Y, Sanford E, Yantiss RK, Balasubramanian S, Stephens PJ, Schultz N, Oren M, Tang L, Kelsen D. (2016). Genomic Alterations Observed in Colitis-Associated Cancers Are Distinct From Those Found in Sporadic Colorectal Cancers and Vary by Type of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 151(2), 278-87 e6.
- [123] Robles AI, Traverso G, Zhang M, Roberts NJ, Khan MA, Joseph C, Lauwers GY, Selaru FM, Popoli M, Pittman ME, Ke X, Hruban RH, Meltzer SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Harris CC, Papadopoulos N. (2016). Whole-Exome Sequencing

Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology*, 150(4), 931-43.

[124] Agouridis AP, Elisaf M y Milionis HJ. (2011). An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 24(3), 181-7.

[125] Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M, Paradowski L, Gamian A. (2012). Lipid peroxidation markers in Crohn's disease: the associations and diagnostic value. *Clin Chem Lab Med*, 50(8), 1359-66.

[126] Grzybowska-Chlebowczyk U, Wysocka-Wojakiewicz P, Jasielska M, Cukrowska B, Wiecek S, Kniazewska M, Chudek J. (2018). Oxidative and Antioxidative Stress Status in Children with Inflammatory Bowel Disease as a Result of a Chronic Inflammatory Process. *Mediators of inflammation*, 2018, 4120973.

[127] Alzoghaibi MA, Al Mofleh IA y Al-Jebreen AM. (2007). Lipid peroxides in patients with inflammatory bowel disease. *Saudi J Gastroenterol*, 13(4), 187-90.

[128] Luceri C, Bigagli E, Agostiniani S, Giudici F, Zambonin D, Scaringi S, Ficari F, Lodovici M, Malentacchi C. (2019). Analysis of Oxidative Stress-Related Markers in Crohn's Disease Patients at Surgery and Correlations with Clinical Findings. *Antioxidants (Basel)*, 8(9).

[129] Buda A, Hatem G, Neumann H, D'Inca R, Mescoli C, Piselli P, Jackson J, Bruno M, Sturniolo GC. (2014). Confocal laser endomicroscopy for prediction of disease relapse in ulcerative colitis: a pilot study. *Journal of Crohn's & colitis*, 8(4), 304-11.

[130] Mace V, Ahluwalia A, Coron E, Le Rhun M, Boureille A, Bossard C, Mosnier JF, Matysiak-Budnik T, Tarnawski AS. (2015). Confocal laser endomicroscopy: a new gold standard for the assessment of mucosal healing in ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 30 Suppl 1, 85-92.

[131] Delporte C, Van Antwerpen P, Vanhamme L, Roumeguere T, Zouaoui Boudjeltia K. (2013). Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies. *Mediators of inflammation*, 2013, 971579.

[132] Waters JP, Pober JS y Bradley JR. (2013). Tumour necrosis factor and cancer. *The Journal of pathology*, 230(3), 241-8.

- [133] Leppkes M, Roulis M, Neurath MF, Kollias G, Becker C. (2014). Pleiotropic functions of TNF-alpha in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. *International immunology*, 26(9), 509-15.
- [134] Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N. (2008). Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 560-70.
- [135] Yang Y, Gharaibeh RZ, Newsome RC, Jobin C. (2020). Amending microbiota by targeting intestinal inflammation with TNF blockade attenuates development of colorectal cancer. *Nature Cancer*, 1(7), 723-34.
- [136] Singh S, Mayengbam SS, Chouhan S, Deshmukh B, Ramteke P, Athavale D, Bhat MK. (2020). Role of TNFalpha and leptin signaling in colon cancer incidence and tumor growth under obese phenotype. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866(5), 165660.
- [137] Hale LP y Greer PK. (2012). A novel murine model of inflammatory bowel disease and inflammation-associated colon cancer with ulcerative colitis-like features. *PloS one*, 7(7), e41797.
- [138] Liu Z, Brooks RS, Ciappio ED, Kim SJ, Crott JW, Bennett G, Greenberg AS, Mason JB. (2012). Diet-induced obesity elevates colonic TNF-alpha in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(10), 1207-13.
- [139] Singh UP, Singh NP, Murphy EA, Price RL, Fayad R, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. (2016). Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine*, 77, 44-9.
- [140] Feitosa MC, Lima VB, Moita Neto JM, Marreiro Ddo N. (2013). Plasma concentration of IL-6 and TNF-alpha and its relationship with zincemia in obese women. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 59(5), 429-34.
- [141] Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, Wang L, M'Koma AE. (2015). Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. *Clin Med Insights Gastroenterol*, 8, 29-44.
- [142] Marques-Vidal P, Bochud M, Bastardot F, Luscher T, Ferrero F, Gaspoz JM, Paccaud F, Urwyler A, von Kanel R, Hock C, Waeber G, Preisig M, Vollenweider P. (2012). Association between inflammatory and obesity markers in a Swiss population-based sample (CoLaus Study). *Obes Facts*, 5(5), 734-44.

- [143] Stanilov N, Miteva L, Dobрева Z, Stanilova S. (2014). Colorectal cancer severity and survival in correlation with tumour necrosis factor-alpha. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 28(5), 911-7.
- [144] Alkhayyat M, Abureesh M, Gill A, Khoudari G, Abou Saleh M, Mansoor E, Regueiro M. (2020). Lower Rates of Colorectal Cancer in Patients With Inflammatory Bowel Disease Using Anti-TNF Therapy. *Inflamm Bowel Dis*.
- [145] De Simone V, Franze E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, Sica GS, Sileri P, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G, Stolfi C. (2015). Th17-type cytokines, IL-6 and TNF-alpha synergistically activate STAT3 and NF-kB to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, 34(27), 3493-503.
- [146] Zhao P y Zhang Z. (2018). TNF-alpha promotes colon cancer cell migration and invasion by upregulating TROP-2. *Oncology letters*, 15(3), 3820-7.
- [147] Kobelt D, Zhang C, Clayton-Lucey IA, Glauben R, Voss C, Siegmund B, Stein U. (2020). Pro-inflammatory TNF-alpha and IFN-gamma Promote Tumor Growth and Metastasis via Induction of MACC1. *Frontiers in immunology*, 11, 980.
- [148] Bradford EM, Ryu SH, Singh AP, Lee G, Goretsky T, Sinh P, Williams DB, Cloud AL, Gounaris E, Patel V, Lamping OF, Lynch EB, Moyer MP, De Plaen IG, Shealy DJ, Yang GY, Barrett TA. (2017). Epithelial TNF Receptor Signaling Promotes Mucosal Repair in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of immunology*, 199(5), 1886-97.
- [149] Miyoshi H y Stappenbeck TS. (2013). In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nat Protoc*, 8(12), 2471-82.
- [150] Bell SM, Schreiner CM, Wert SE, Mucenski ML, Scott WJ, Whitsett JA. (2008). R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development*, 135(6), 1049-58.
- [151] Heijmans J, van Lidth de Jeude JF, Koo BK, Rosekrans SL, Wielenga MC, van de Wetering M, Ferrante M, Lee AS, Onderwater JJ, Paton JC, Paton AW, Mommaas AM, Kodach LL, Hardwick JC, Hommes DW, Clevers H, Muncan V, van den Brink GR. (2013). ER stress causes rapid loss of intestinal epithelial stemness through activation of the unfolded protein response. *Cell Rep*, 3(4), 1128-39.
- [152] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, 9(4), 493-501.

- [153] Burgueno JF, Fritsch J, Santander AM, Brito N, Fernandez I, Pignac-Kobinger J, Conner GE, Abreu MT. (2019). Intestinal Epithelial Cells Respond to Chronic Inflammation and Dysbiosis by Synthesizing H₂O₂. *Frontiers in physiology*, 10, 1484.
- [154] Livak KJ y Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-8.
- [155] Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, Barrette TR, Anstet MJ, Kincead-Beal C, Kulkarni P, Varambally S, Ghosh D, Chinnaiyan AM. (2007). OncoPrint 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*, 9(2), 166-80.
- [156] Gaedcke J, Grade M, Jung K, Camps J, Jo P, Emons G, Gehoff A, Sax U, Schirmer M, Becker H, Beissbarth T, Ried T, Ghadimi BM. (2010). Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes, chromosomes & cancer*, 49(11), 1024-34.
- [157] Kaiser S, Park YK, Franklin JL, Halberg RB, Yu M, Jessen WJ, Freudenberg J, Chen X, Haigis K, Jegga AG, Kong S, Sakthivel B, Xu H, Reichling T, Azhar M, Boivin GP, Roberts RB, Bissahoyo AC, Gonzales F, Bloom GC, Eschrich S, Carter SL, Aronow JE, Kleimeyer J, Kleimeyer M, Ramaswamy V, Settle SH, Boone B, Levy S, Graff JM, Doetschman T, Groden J, Dove WF, Threadgill DW, Yeatman TJ, Coffey RJ, Jr., Aronow BJ. (2007). Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome biology*, 8(7), R131.
- [158] Hong Y, Downey T, Eu KW, Koh PK, Cheah PY. (2010). A 'metastasis-prone' signature for early-stage mismatch-repair proficient sporadic colorectal cancer patients and its implications for possible therapeutics. *Clinical & experimental metastasis*, 27(2), 83-90.
- [159] Skrzypczak M, Goryca K, Rubel T, Paziewska A, Mikula M, Jarosz D, Pachlewski J, Oledzki J, Ostrowski J. (2010). Modeling oncogenic signaling in colon tumors by multidirectional analyses of microarray data directed for maximization of analytical reliability. *PloS one*, 5(10).
- [160] Ribatti D, Tamma R y Annese T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol*, 13(6), 100773.

- [161] Lu J, Mitra S, Wang X, Khaidakov M, Mehta JL. (2011). Oxidative stress and lectin-like ox-LDL-receptor LOX-1 in atherogenesis and tumorigenesis. *Antioxidants & redox signaling*, 15(8), 2301-33.
- [162] Chae JS, Kim OY, Paik JK, Kang R, Seo WJ, Jeong TS, Sweeney G, Lee SH, Lee JH. (2011). Association of Lp-PLA(2) activity and LDL size with interleukin-6, an inflammatory cytokine and oxidized LDL, a marker of oxidative stress, in women with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, 218(2), 499-506.
- [163] Liu H, Liu X, Zhang C, Zhu H, Xu Q, Bu Y, Lei Y. (2017). Redox Imbalance in the Development of Colorectal Cancer. *J Cancer*, 8(9), 1586-97.
- [164] Rainis T, Maor I, Lanir A, Shnizer S, Lavy A. (2007). Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon. *Dig Dis Sci*, 52(2), 526-30.
- [165] Che XH, Chen CL, Ye XL, Weng GB, Guo XZ, Yu WY, Tao J, Chen YC, Chen X. (2016). Dual inhibition of COX-2/5-LOX blocks colon cancer proliferation, migration and invasion in vitro. *Oncology reports*, 35(3), 1680-8.
- [166] Murase R, Taketomi Y, Miki Y, Nishito Y, Saito M, Fukami K, Yamamoto K, Murakami M. (2017). Group III phospholipase A2 promotes colitis and colorectal cancer. *Scientific reports*, 7(1), 12261.
- [167] Lu J, Jiang G, Wu Y, Antony S, Meitzler JL, Juhasz A, Liu H, Roy K, Makhlouf H, Chuaqui R, Butcher D, Konate MM, Doroshov JH. (2020). NADPH oxidase 1 is highly expressed in human large and small bowel cancers. *PloS one*, 15(5), e0233208.
- [168] Kanthan R, Senger JL y Kanthan SC. (2012). Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Pathology research international*, 2012, 597497.
- [169] Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka T, Mergl R, Kirkby KC, Fasshauer M, Stumvoll M, Holdt LM, Teupser D, Hegerl U, Himmerich H. (2015). Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PloS one*, 10(3), e0121971.
- [170] Gonzalez-Chavarria I. (2016). Función del receptor para la lipoproteína de baja densidad oxidada LOX-1 en la progresión tumoral del cáncer de próstata. Trabajo de grado, Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.
- [171] Delgado ME y Brunner T. (2019). The many faces of tumor necrosis factor signaling in the intestinal epithelium. *Genes and immunity*, 20(8), 609-26.

- [172] Zabirnyk O, Liu W, Khalil S, Sharma A, Phang JM. (2010). Oxidized low-density lipoproteins upregulate proline oxidase to initiate ROS-dependent autophagy. *Carcinogenesis*, 31(3), 446-54.
- [173] Li H, Li XX, Ma Q, Cui J. (2013). The variability of oxLDL-induced cytotoxicity on different types of cell lines. *Cell biochemistry and biophysics*, 67(2), 635-44.
- [174] Zettler ME, Prociuk MA, Austria JA, Massaeli H, Zhong G, Pierce GN. (2003). OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(2), H644-53.
- [175] Leve F, Peres-Moreira RJ, Binato R, Abdelhay E, Morgado-Diaz JA. (2015). LPA Induces Colon Cancer Cell Proliferation through a Cooperation between the ROCK and STAT-3 Pathways. *PloS one*, 10(9), e0139094.
- [176] Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. (2016). TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends in cell biology*, 26(4), 249-61.
- [177] Derynck R y Weinberg RA. (2019). EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. *Developmental cell*, 49(3), 313-6.
- [178] Shen Z, Zhou R, Liu C, Wang Y, Zhan W, Shao Z, Liu J, Zhang F, Xu L, Zhou X, Qi L, Bo F, Ding Y, Zhao L. (2017). MicroRNA-105 is involved in TNF-alpha-related tumor microenvironment enhanced colorectal cancer progression. *Cell Death Dis*, 8(12), 3213.
- [179] Wang H, Wang HS, Zhou BH, Li CL, Zhang F, Wang XF, Zhang G, Bu XZ, Cai SH, Du J. (2013). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PloS one*, 8(2), e56664.
- [180] Guba M, Seeliger H, Kleespies A, Jauch KW, Bruns C. (2004). Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*, 19(6), 510-7.
- [181] Parra NC, Mansilla R, Aedo G, Vispo NS, Gonzalez-Horta EE, Gonzalez-Chavarria I, Castillo C, Camacho F, Sanchez O. (2019). Expression and Characterization of Human Vascular Endothelial Growth Factor Produced in SiHa Cells Transduced with Adenoviral Vector. *Protein J*, 38(6), 693-703.
- [182] Kazemi M, Carrer A, Moimas S, Zandona L, Bussani R, Casagrande B, Palmisano S, Prelazzi P, Giacca M, Zentilin L, De Manzini N, Giacca M, Zacchigna S. (2016). VEGF121 and VEGF165 differentially promote vessel maturation and tumor growth in mice and humans. *Cancer gene therapy*, 23(5), 125-32.

[183] Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA, Bjornslett M, Meza-Zepeda LA, Eknaes M, Lind GE, Myklebost O, Skotheim RI, Sveen A, Lothe RA. (2017). Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Molecular cancer*, 16(1), 116.

[184] Date S y Sato T. (2015). Mini-Gut Organoids: Reconstitution of the Stem Cell Niche. *Annual review of cell and developmental biology*, 31, 269-89.

[185] Burgueno JF, Fritsch J, Gonzalez EE, Landau KS, Santander AM, Fernandez I, Hazime H, Davies JM, Santaolalla R, Phillips MC, Diaz S, Dheer R, Brito N, Pignac-Kobinger J, Fernandez E, Conner GE, Abreu MT. (2021). Epithelial TLR4 Signaling Activates DUOX2 to Induce Microbiota-Driven Tumorigenesis. *Gastroenterology*, 160(3), 797-808 e6.



9. ANEXOS

9.1- Anexo 1: Listado de reactivos

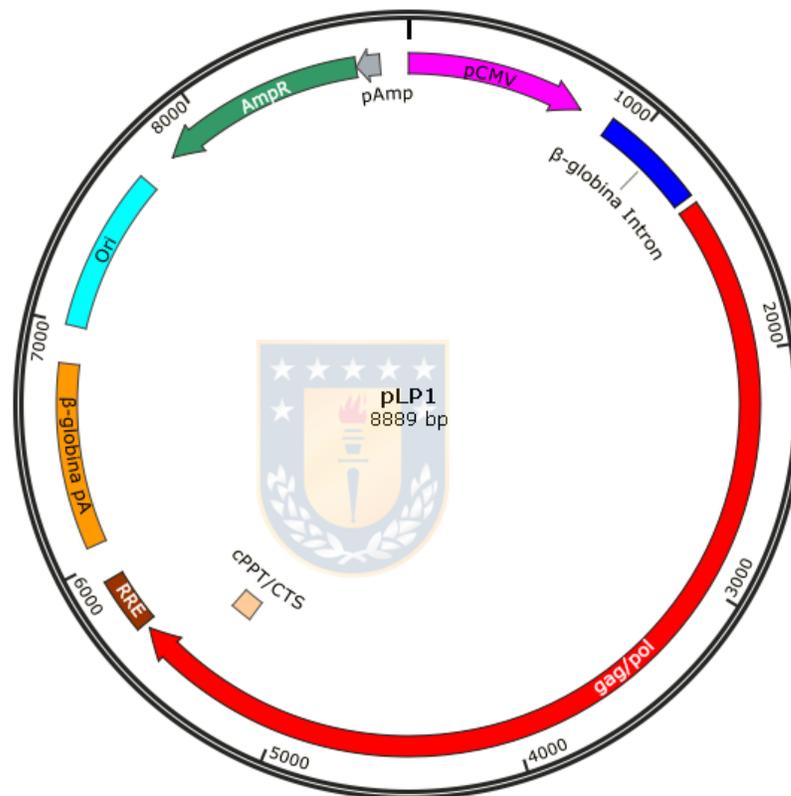
Nombre	Compañía	Catálogo
Acetato de potasio - KAc	Santa Cruz Biotechnology	sc-202295B
Ácido acético	Merck	1018302500
Ácido ascórbico	Sigma	A5960
Ácido bórico	Winkler	AC-0050
Ácido tiobarbitúrico	Merck	1.0818
Ácido tricloroacético	Winkler	AC-0170
Acrilamida	Sigma	A8887
Agua biología molecular	Corning	46-000-CM
Azul de Coomassie Brilliant R250	Merk	112553
Barbital de sodio	Sigma	B0500
Bis-Acrilamida	Amresco	0172-250G
Bromofenol azul	Merck	108122
Bromuro de etidio	Winkler	BM-0710
Bromuro de Potasio - KBr	Winkler	PO 1235
Cloroformo	Winkler	CL-0595
Cloruro de calcio - CaCl ₂	Merck	1023821000
Cloruro de litio - LiCl	Merck	105679
Cloruro de potasio - KCl	Merck	1049361000
Cloruro de sodio - NaCl	Merck	1162245000
Dihidrógeno fosfato de potasio – KH ₂ PO ₄	Merck	1048731000
Dodecil sulfato de sodio - SDS	Merck	428015
EDTA	Winkler	ED-0769
Etanol absoluto	Merck	1070172511
Glicerol	Winkler	BM-0800
Hidrógeno fosfato de disodio – Na ₂ HPO ₄	Merck	1065861000
Hidróxido de sodio - NaOH	Merck	1064985000
Isopropanol	Merck	1096342511
Metanol	Merck	1070182511
Paraformaldehído - PFA	Merck	104005
Persulfato de amonio	Winkler	BM-0250
Rojo ponceau S	Winkler	BM-1492
SDS	Merck	428015
Sulfato de Cobre II - CuSO ₄	Merck	1027901000
Sulfato de Hierro II - FeSO ₄	Winkler	HI-0880
TEMED	Calbiochem	8920-OP
Tris base	Santa Cruz Biotechnology	sc-3715B
Tween 20	Calbiochem	9480-OP
β-mercaptoetanol	Sigma	M3148

Fuente: elaboración propia

9.2- Anexo 2. Mapa de plasmidios para generación de vectores

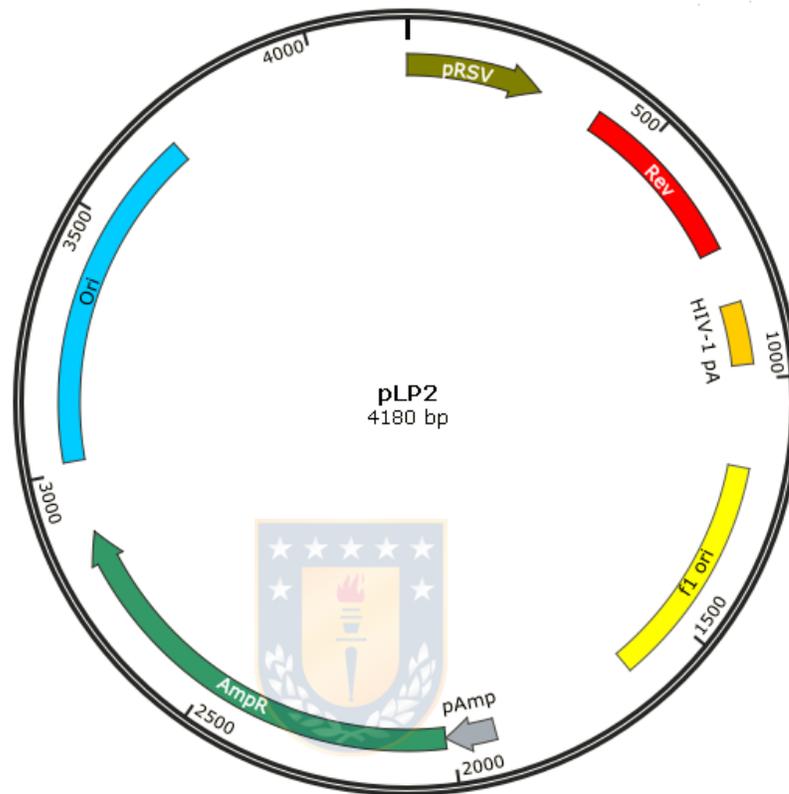
lentivirales

9.2.1- pLP1



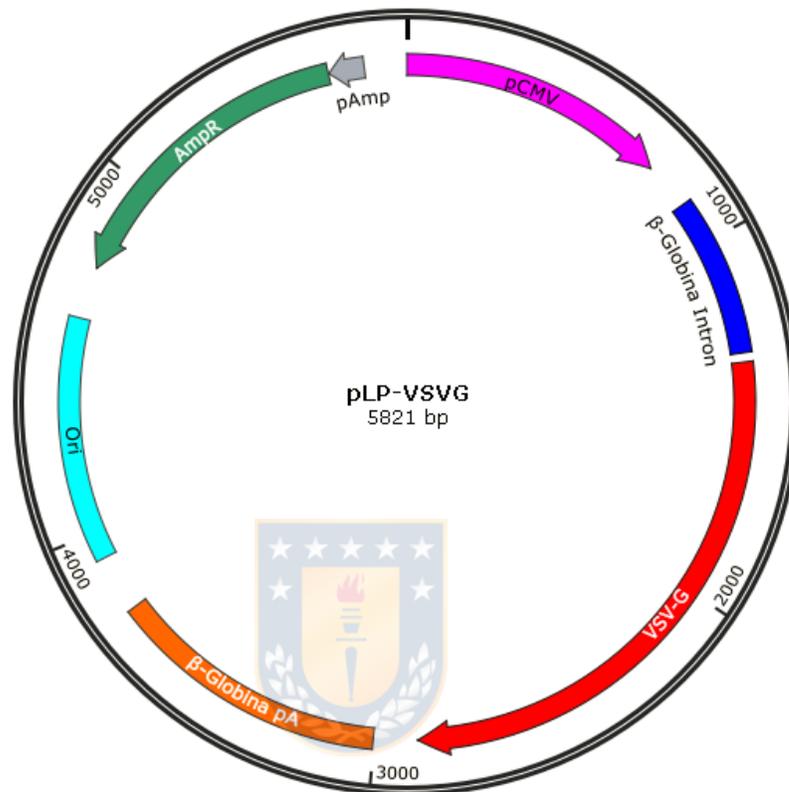
Mapa de plasmidio pLP1. pCMV: promotor temprano/tardío de citomegalovirus. Gag/pol: Secuencia codificante para las proteínas estructurales y enzimas del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1). cPPT/CTS: tracto central de polipurina y secuencia de terminación central. RRE: elemento de respuesta a la proteína REV. β-globina pA: señal de poliadenilación de la β-globina humana. Ori: Origen de replicación bacteriano. AmpR: gen *bla* codificante para la enzima β-lactamasa. pAmp: promotor del gen *bla*. El mapa se elaboró con el programa SnapGene, versión 1.13. *Fuente: elaboración propia.*

9.2.2- pLP2



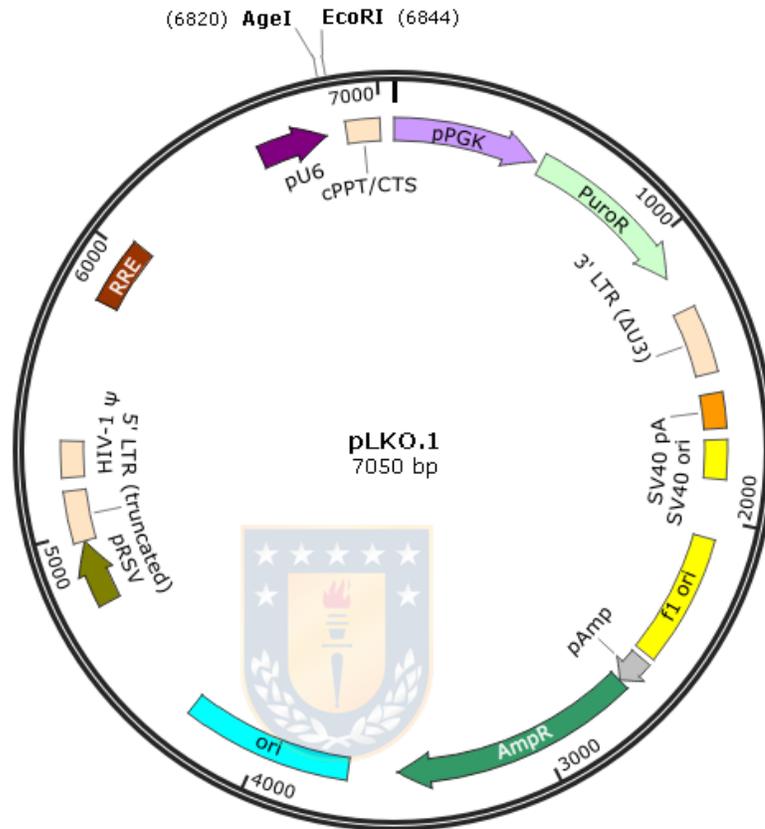
Mapa de plasmidio pLP2. pRSV: promotor de virus de sarcoma de Rous. Rev: Secuencia codificante para la proteína Rev de VIH-1. HIV-1 pA: señal de poliadenilación de VIH-1. f1 ori: Origen de replicación de fago f1. Ori: Origen de replicación bacteriano. pAmp: promotor del gen *bla*. AmpR: gen *bla* codificante para la enzima β -lactamasa. El mapa se elaboró con el programa SnapGene, versión 1.13. Fuente: elaboración propia.

9.2.3- pLP-VSVG



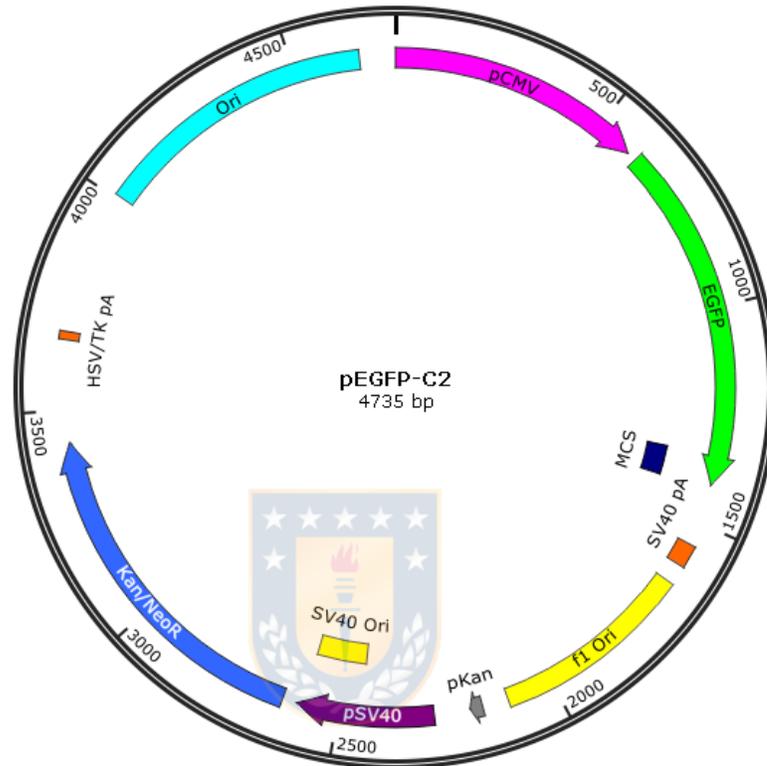
Mapa de plasmidio pLP-VSVG. pCMV: promotor temprano/tardío de citomegalovirus. VSVG: Secuencia codificante para la proteína G de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular. β-globina pA: señal de poliadenilación del gen β-globina humana. Ori: Origen de replicación bacteriano. AmpR: gen *bla* codificante para la enzima β-lactamasa. pAmp: promotor del gen *bla*. El mapa se elaboró con el programa SnapGene, versión 1.13. Fuente: elaboración propia.

9.2.4- pLKO.1



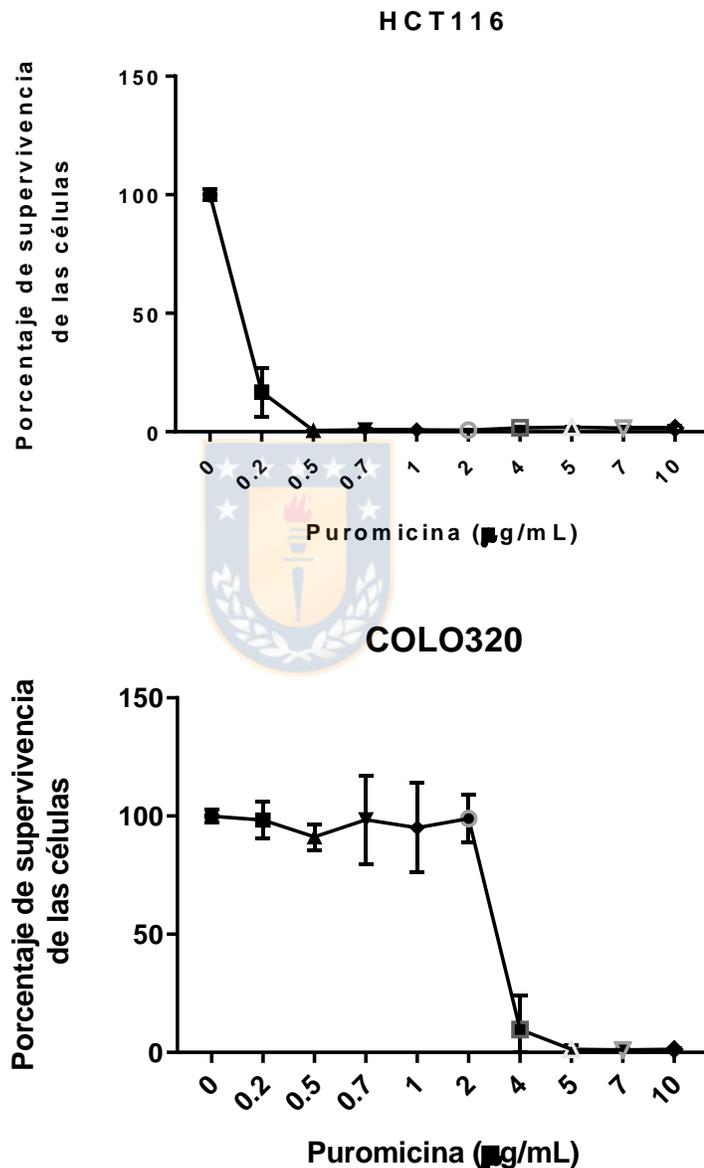
Mapa de plasmidio pLKO.1. pU6: promotor de snARN U6 humano. cPPT/CTS: tracto central de polipurina y secuencia de terminación central. pPGK: promotor del gen *PDK1* humano (fosfoglicerato quinasa 1). PuroR: gen *pac*, codificante para la enzima puromicina N-acetil transferasa. 3'LTR: secuencia de repetición larga 3' de VIH-1. SV40 pA: Señal de poliadenilación de virus simio 40. SV40 ori: Origen de replicación de virus simio 40. f1 ori: origen de replicación de fago filamentoso f1. pAmp: promotor del gen *bla*. AmpR: gen *bla* codificante para la enzima β -lactamasa. ori: Origen de replicación bacteriano. pRSV: Promotor de virus de sarcoma de Rous. 5'LTR: secuencia de repetición larga 5' de VIH-1 truncada. HIV-1 Ψ: Señal de encapsidación de ARN viral. RRE: elemento de respuesta a la proteína REV. El mapa se elaboró con el programa SnapGene, versión 1.13. *Fuente: elaboración propia.*

9.2.5- E: pEGFP-C2



Mapa de plasmidio pEGFP-C2. pCMV: promotor temprano/tardío de citomegalovirus. EGFP: Proteína verde fluorescente. MCS: sitio múltiple de clonamiento. SV40 pA: Señal de poliadenilación de virus simio 40. f1 ori: origen de replicación de fago filamentoso f1. pKan: promotor del gen *nptII*. pSV40: promotor temprano de virus simio 40. SV40 ori: Origen de replicación de virus simio 40. Kan/NeoR: gen *nptII*, codificante para la enzima neomicina fosfotransferasa II. HSV/TK pA: señal de poliadenilación del gen timidina quinasa del virus herpes simple tipo I. El mapa se elaboró con el programa SnapGene, versión 1.13. *Fuente: elaboración propia.*

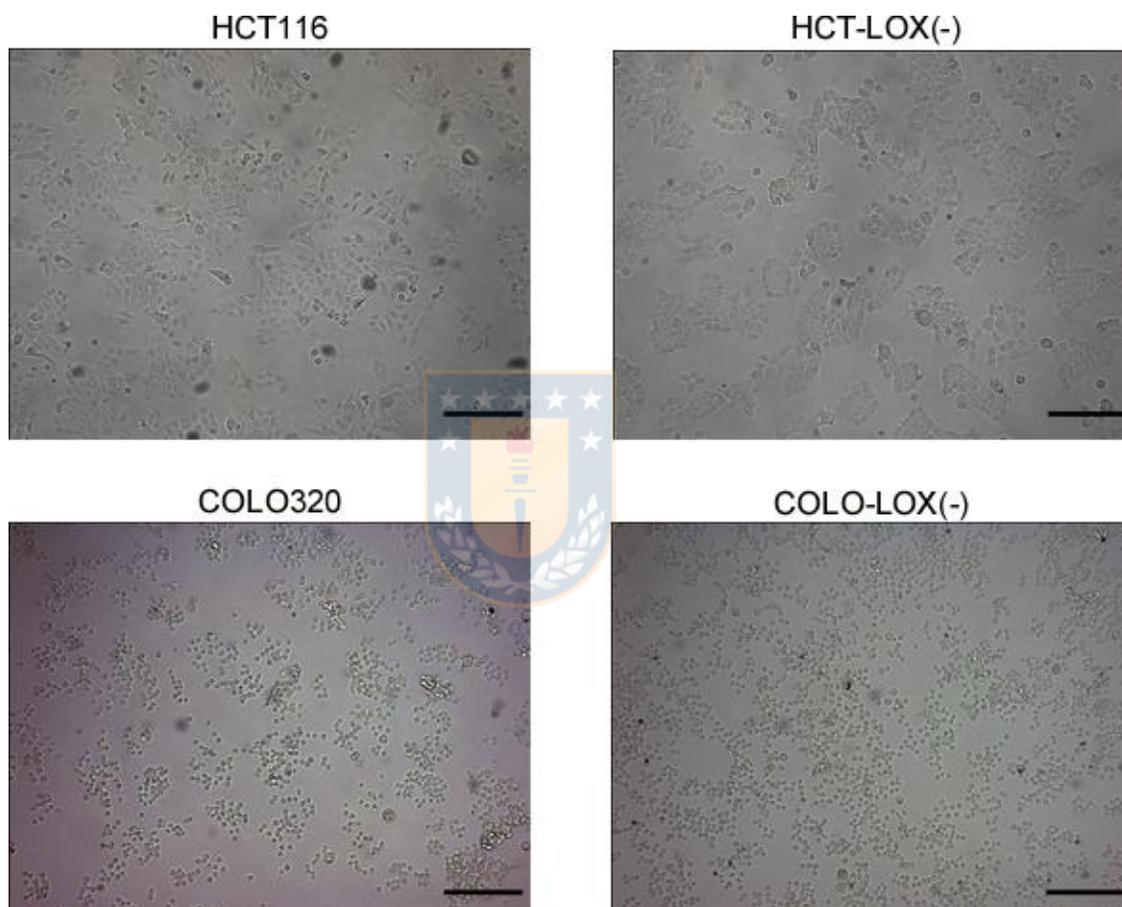
9.3- Anexo 3: Curvas de letalidad de puromicina en células HCT116 (A) y COLO320 (B)



Curvas de letalidad de puromicina en células de CCR. Las células HCT116 y COLO320 se cultivaron con 0; 0,2; 0,5; 0,7; 1; 2; 4; 5; 7 y 10 µg/mL de puromicina por 10 días y se monitoreó la viabilidad celular mediante ensayo de MTT. La concentración de puromicina escogida para la selección de colonias celulares resistentes a puromicina fue de 0,5 µg/mL para las células HCT116 y de 5 µg/mL para las células COLO320. Fuente: elaboración propia.

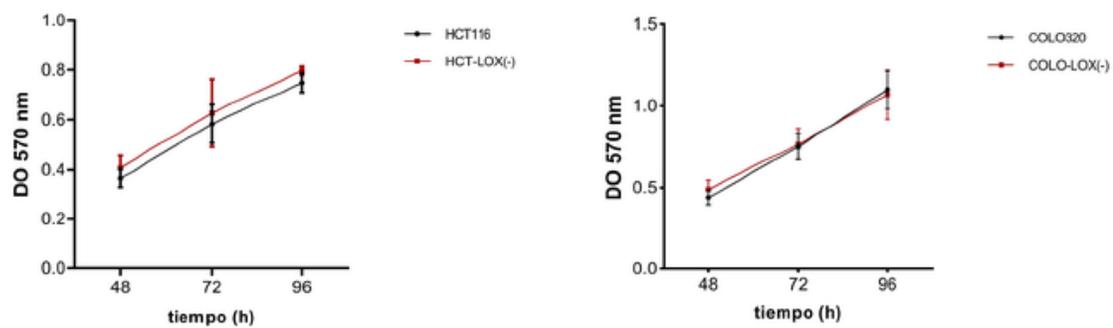
9.4- Anexo 4. Comparación de la morfología de las células HCT116 y HCT116/LOX(-) (A) y sus velocidades de crecimiento (B)

A



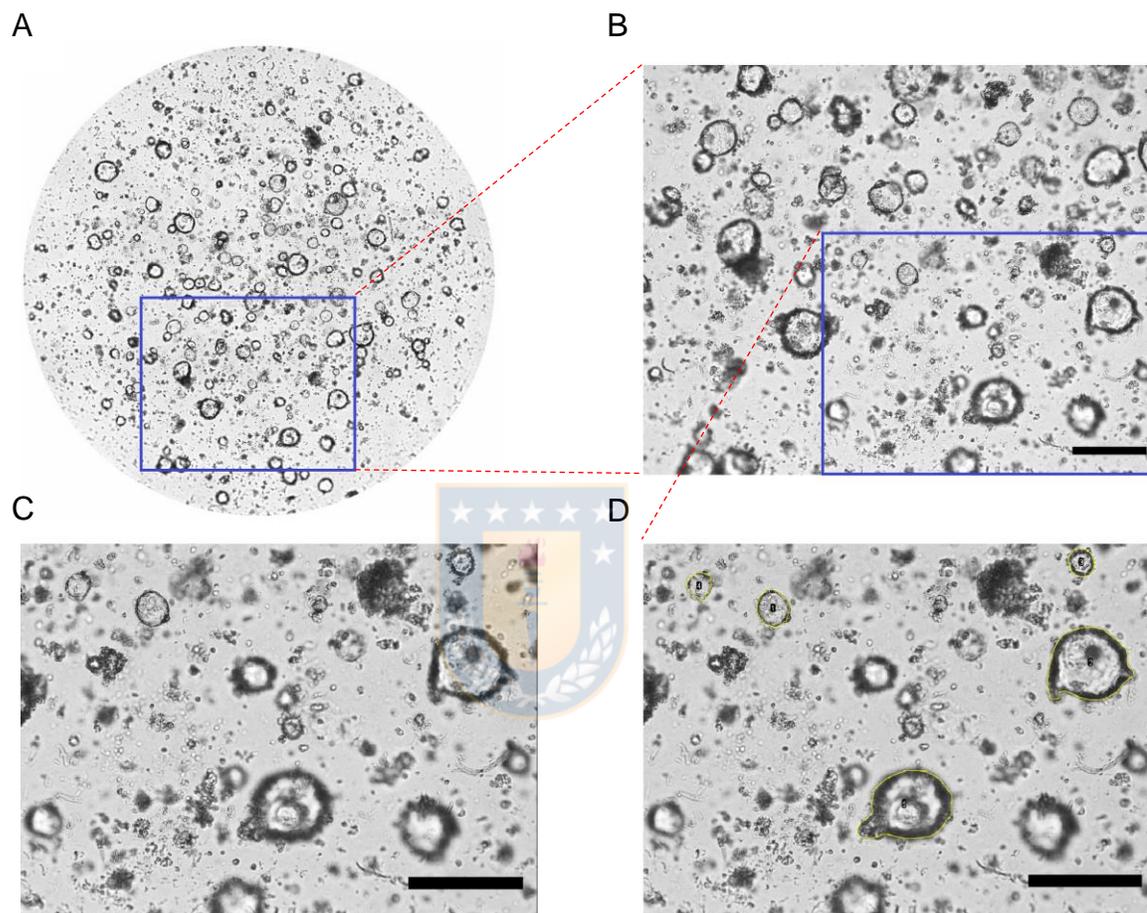
Morfología de células de CCR con expresión disminuida del receptor LOX-1. Las células HCT116, HCT116-LOX(-), COLO320 y COLO-LOX(-) se cultivaron por 48 h. Microfotografía captada con microscopio OLYMPUS IX81, aumento 10x. Barra: 200 μ m. Fuente: elaboración propia.

B



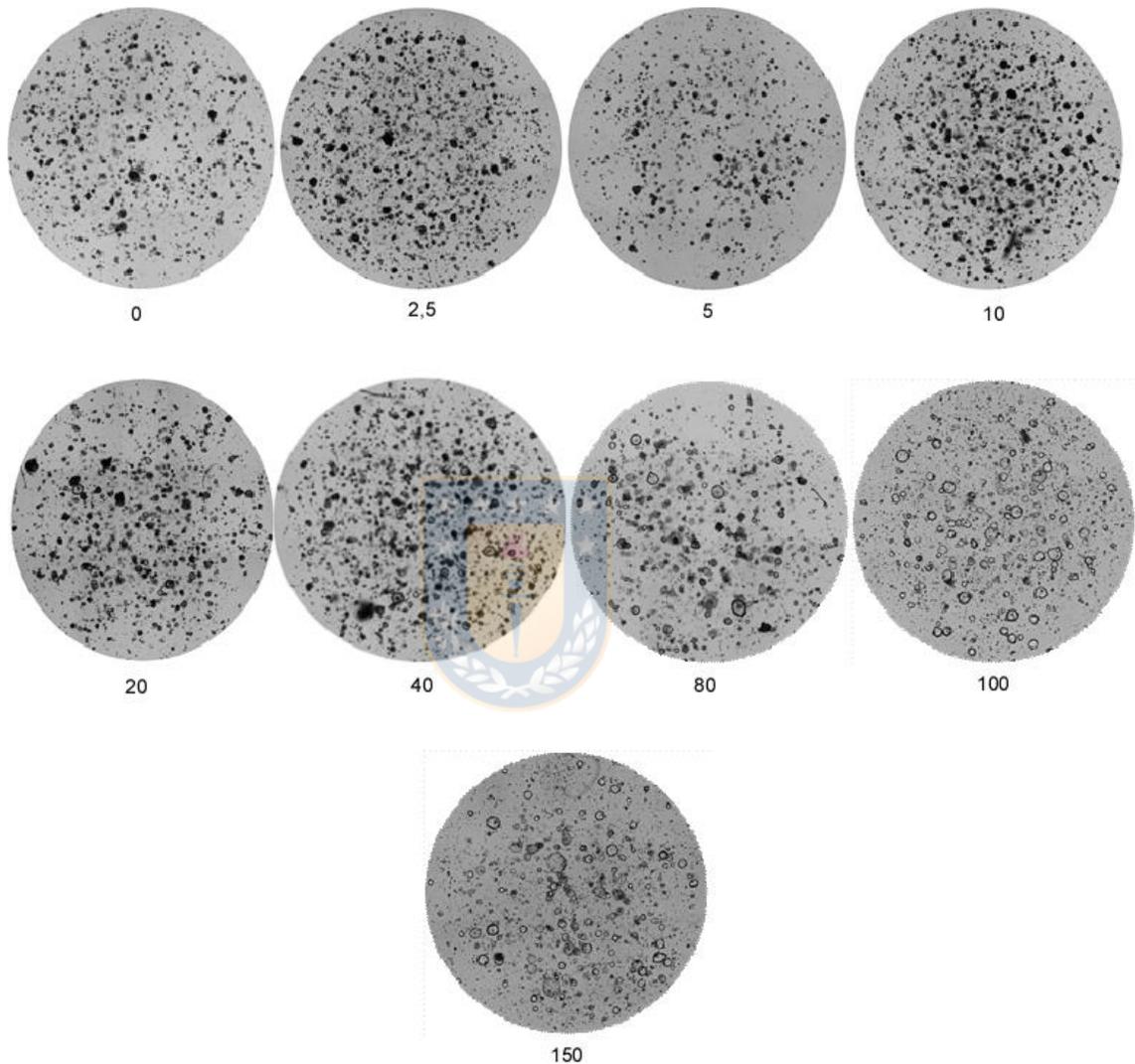
Ensayo de proliferación celular monitoreado por MTT. Las células HCT116, HCT116-LOX(-), COLO320 y COLO-LOX(-) se cultivaron por 48, 72 y 96 h y se cuantificó la formación de formazán en un espectrofotómetro. No hay diferencias significativas en el crecimiento celular entre las líneas celulares parentales y las células con expresión disminuida del receptor LOX-1 en los 3 tiempos estudiados ($p > 0.05$). Cada condición se ensayó por quintuplicado. Las barras representan la media \pm SD, $n=3$. ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Fuente: elaboración propia.

9.5- Anexo 5: Determinación de área de organoides



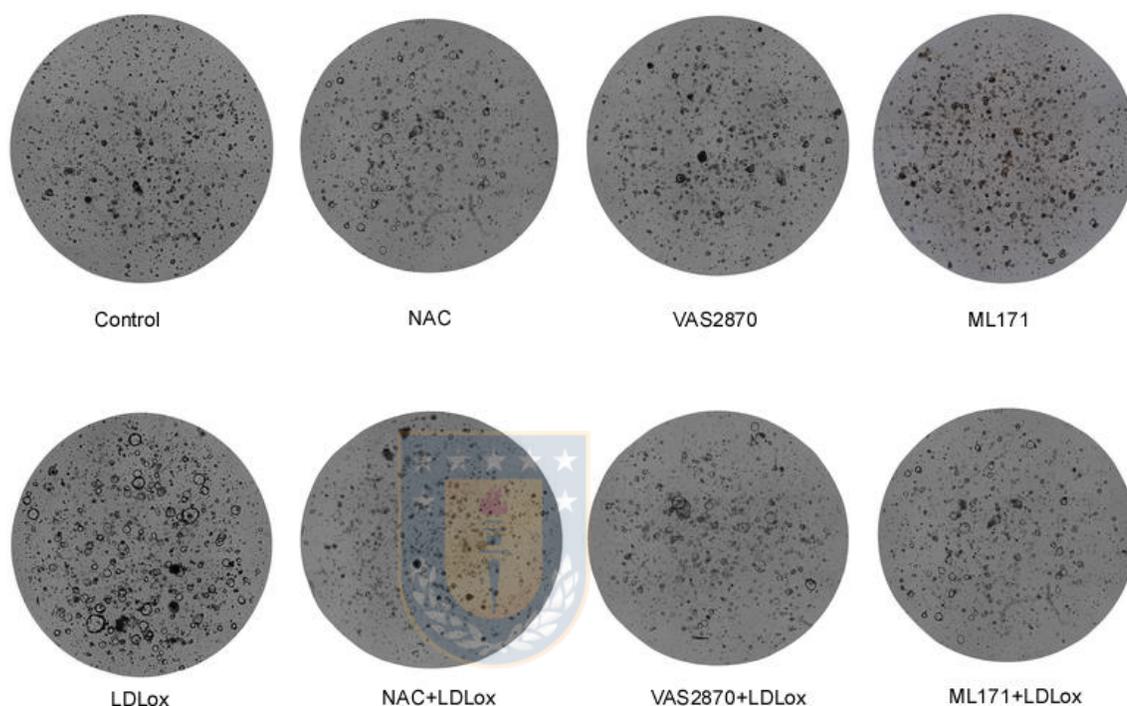
Metodología para la determinación del área de los organoides. Se tomaron microfotografías solapadas para abarcar toda la gota de matrigel con cámara NIKON ECLIPSE y una magnificación 4x. En el programa ImageJ se estableció la escala para las imágenes (1 píxel equivale a 0,54 μm) para realizar la cuantificación del área de los organoides. **A)** Imagen de la gota de matrigel formada por el solapamiento de 12-15 microfotografías. **B)** Microfotografías de contraste de los organoides, aumento 4x, barra de escala: 100 μm (cuadro azul de la figura A). **C)** Ampliación de la imagen (ZOOM, cuadro azul) para definir el área de los organoides. **D)** El área de la superficie de los organoides se definió con la herramienta polígono del programa ImageJ (borde de color amarillo) y posteriormente se seleccionó la opción cuantificar área.

9.6- Anexo 6: Imágenes de organoides estimulados con concentraciones crecientes de LDLox



Crecimiento de organoides de colon humano tratados con concentraciones crecientes de LDLox. Los organoides de colon humano se sembraron por 2 días en matrigel y se estimularon con las concentraciones indicadas de LDLox por 4 días. Se adquirieron múltiples imágenes solapadas con un aumento de 4x que se empalmaron en el programa ImageJ para abarcar todos los organoides presentes en la gota de matrigel.

9.7- Anexo 7: Imágenes de organoides estimulados con 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox e inhibidores de la formación de ROS



Crecimiento de organoides de colon humano tratados con LDLox e inhibidores de la formación de ROS de LDLox. Los organoides de colon humano se incubaron con 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDLox con y sin 10 μM de VAS2870, 0,25 μM de ML171 y 2,5 mM de NAC por 4 días. Se adquirieron múltiples imágenes solapadas con un aumento de 4x que se empalmaron en el programa ImageJ para abarcar todos los organoides presentes en la gota de matrigel.