



Universidad de Concepción

Facultad Farmacia

**CONTRIBUCIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS
NATIVAS Y OXIDADAS A LA
ESTEROIDOGENESIS DE CÉLULAS DE CÁNCER
DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN
Y SU PROGRESIÓN BIOQUÍMICA.**

POR YERKO IGNACIO RIVAS MORALES.

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad
de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía/Profesor patrocinante: Dr. Iván Antonio González
Chavarría.

Departamento de Fisiopatología

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

Abril 2023

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

A Melania; Raúl, Alejandra, Marcelo y Vicente.

*“Las cosas pequeñas y los actos cotidianos de personas ordinarias son los que
alejan a la maldad...”*

Gandalf el Gris.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo marca el final de un período que, aunque agotador y a ratos un poco ingrato, siempre recordaré con cariño. *“Las aventuras no terminan nunca? Supongo que no. Alguien tiene que llevar adelante la historia”*.

A mi tutor, el Dr. Iván González-Chavarría, por su paciencia y dedicación en mi formación profesional y personal. Sus palabras han sido un consejo claro en los momentos de confusión y aliento en tiempos de angustia.

A mis compañeros de laboratorio; Félix, María Paz y Marcela. No podría haber caído en un grupo mejor. En las frustraciones de la contaminación, los malos resultados y en las otras peripecias de la ciencia, siempre estuvieron dispuestos a dar una mano y a sacar una sonrisa.

A mis abuelos, Melania y Raúl. No podría siquiera imaginar el pasar este tiempo si no hubiera tenido la suerte de tenerlos aun conmigo. En efecto, los abuelos deberían ser eternos.

A mis padres, Alejandra y Marcelo. El mérito de mis logros es también suyo. Su amor y apoyo incondicional han sido y siguen siendo la luz en el túnel.

Y a mi hermano Vicente...Él lo sabe.

¡Gracias totales!

Esta tesis fue desarrollada gracias a los fondos otorgados por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) del Ministerio de Ciencia, Tecnología, conocimiento e Innovación al Dr. Iván González Chavarría mediante el proyecto Fondecyt de Iniciación nº 11181105.

ÍNDICE.

AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
1. RESUMEN.....	XIII
2. INTRODUCCIÓN	15
2.1 Cáncer de próstata. Definición, epidemiología, clasificación y tratamiento.	15
2.2 Papel del receptor de andrógenos en el desarrollo normal y anormal de la próstata.	19
2.3 Cáncer de próstata avanzado, tratamiento y resistencia a ADT.	21
2.4 CRPC y dependencia de la señalización de andrógenos.	23
2.5 Mecanismos de resistencia a terapia de privación de andrógenos y esteroidogénesis intracrina de andrógenos	24

2.6 Vías de obtención de colesterol, estrés oxidativo y su asociación con resistencia a la castración en cáncer de próstata.	30
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	35
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	36
5. HIPÓTESIS	37
6. OBJETIVOS	38
6.1. Objetivo General.	38
6.2. Objetivos específicos.	38
6.2.1 Objetivo específico 1.....	38
6.2.2 Objetivo Específico 2.	38
7. METODOLOGÍA.	39
7.1 Cultivo celular.	39
7.2 Tratamiento de los cultivos celulares con LDL nativa y oxidada para el análisis de expresión de enzimas claves de la esteroidogénesis.	40
7.3 Extracción y cuantificación de proteínas	41

7.4 Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes y análisis por Western Blot.	42
7.5 Ensayo de viabilidad celular.....	43
7.6 Análisis de la traslocación nuclear de AR por inmunocitoquímica.	45
7.7 PCR en tiempo real.....	46
7.8 Análisis estadístico.	46
8. RESULTADOS	50
8.1 Lipoproteína de baja densidad oxidada genera un aumento significativo en la expresión de enzimas clave en la esteroidogénesis.	50
8.2 Lipoproteínas de baja densidad oxidada genera aumento en la expresión de marcadores de progresión de CRPC y resistencia a ADT.	61
8.3 Lipoproteína de baja densidad oxidada genera un aumento en la sobrevivencia de células de CaP dependiente de andrógenos, LNCaP, en respuesta a la privación de andrógenos.	65
8.4 Lipoproteína de baja densidad oxidada promueve la traslocación nuclear de AR y la expresión de ARNm de PSA en células de CRPC 22RV1 y C4-2B.	67
9. DISCUSIÓN.....	70

10. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	80
11. REFERENCIAS.....	82
12. ANEXO.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la detección y cuantificación de enzimas esteroideogénicas y marcadores de progresión de CRPC.	47
Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot e inmunocitoquímica.	48
Tabla 3: Partidores utilizados para PCR en tiempo real.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías esteroidogénicas generales en el CPRC.	26
Figura 2. Expresión relativa de la enzima CYP17A1 respecto al control sin tratamiento.	52
Figura 3. Expresión relativa de la enzima 3 β -HSD respecto al control sin tratamiento.	54
Figura 4. Expresión relativa de la enzima 17 β -HSD respecto al control sin tratamiento.	57
Figura 5. Expresión relativa de la enzima 5 α -reductasa respecto al control sin tratamiento.	60
Figura 6: Expresión relativa de AR respecto al control sin tratamiento.	63
Figura 7: Expresión relativa de la variante de empalme de AR, AR-V7 respecto al control sin tratamiento.	64
Figura 8. Porcentajes de viabilidad de células LNCaP frente a la privación de andrógenos, en distintas condiciones.....	66
Figura 9: OxLDL promueve la translocación nuclear de AR y la expresión del ARNm del PSA en células C4-2B y 22RV1.	69

Figura 10: Modelo propuesto para la contribución de la lipoproteína de baja densidad oxidada a la esteroidogénesis intratumoral de células de CRPC.⁷⁹

1. RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) avanzado, depende de andrógenos para su proliferación y supervivencia, por lo cual es tratado con terapia de privación de andrógenos (ADT). La mayoría de los pacientes presenta resistencia al tratamiento y desarrollan CaP resistente a la castración (CRPC). El CRPC, paradójicamente, aún depende de la señalización del receptor de andrógenos (AR). Dos de los mecanismos que explican este fenómeno son: 1) La sobreexpresión de AR e isoformas constitutivamente activas como AR-V7 y 2) la esteroidogénesis intracrina (o intratumoral) en donde se genera la expresión de toda la maquinaria para la síntesis de andrógenos partir del colesterol para la activación de AR en condiciones de ADT. Se ha demostrado que las células CRPC disminuyen la síntesis interna de colesterol (vía del mevalonato) y aumentan la captación de lipoproteínas modificadas, por lo cual, la captación exógena de colesterol desde el extracelular cobra relevancia en CRPC. Nuestra hipótesis es que las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL, una forma modificada LDL) y no las lipoproteínas de baja densidad nativas (nLDL) contribuyen significativamente al desarrollo del fenotipo CRPC mediante la promoción de la expresión de enzimas esteroidogénicas y marcadores de progresión en células de CRPC *in vitro*. Nuestros resultados muestran que la LDL oxidada y no LDL contribuye a la esteroidogénesis intratumoral, a través de la sobreexpresión de enzimas esteroidogénicas como

CYP17A1 y AKR1C1 y a través de la inducción de una progresión bioquímica *in vitro* evidenciada por la sobreexpresión de PSA, AR y AR-V7, en las líneas celulares C4-2B y 22RV1, incrementado su fenotipo CRPC.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer de próstata. Definición, epidemiología, clasificación y tratamiento.

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad crónica a nivel mundial. Se estima que en el año 2020 fueron diagnosticados 20 millones de casos y se produjeron alrededor de 10 millones de decesos por dicha patología (GLOBOCAN, 2022a). A nivel nacional, el panorama resulta preocupante, ya que en el año 2019 las neoplasias (tumores) se convirtieron en la principal causa de muerte por primera vez en la historia, superando incluso a las enfermedades cardiovasculares.(Estadísticas, 2019).

El cáncer de próstata (CaP) se posiciona como el cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial y nacional (GLOBOCAN, 2022b). El CaP se define como una neoplasia que se presenta en hombres, generalmente mayores de 50 años. Se caracteriza por un crecimiento lento y también por poseer una alta incidencia. Así en más del 70 % de las autopsias de hombres mayores de 80 años se encuentra un tumor prostático (MINSAL, 2015).

Particularmente, en Chile, en el año 2020 el CaP se posicionó como el cáncer más frecuente y la mayor causa de muerte por cáncer en hombres, cuyos casos registrados de incidencia y mortalidad fueron de 8160 y 2300 individuos, respectivamente. Además, se prevé que ambas cifras se dupliquen al año 2040 (GLOBOCAN, 2022c). Así, el CaP genera un interés particular pues corresponde a un problema de salud pública a nivel nacional y mundial.

Se han establecido múltiples factores de riesgo para el CaP, los que se clasifican en endógenos y exógenos. Los factores endógenos son: la edad (Bechis, Carroll, & Cooperberg, 2011); el estrés oxidativo, que es inherente al CaP y es requerido para el desarrollo de un fenotipo de mayor agresividad (Kumar, Koul, Khandrika, Meacham, & Koul, 2008), y también los factores genéticos y raciales que son determinantes para el desarrollo de esta patología (Gandaglia et al., 2021). En este contexto, hombres mayores afrodescendientes son la población más propensa a padecer CaP (Giona, 2021). Por otro lado, los factores exógenos involucran componentes ambientales y conductuales, como la exposición a carcinogénicos o la dieta. En ese sentido, se ha asociado la exposición a ciertos compuestos químicos, conocidos como alteradores endocrinos (EDC's), los que interfieren con la función hormonal y los procesos de crecimiento, desarrollo y carcinogénesis, especialmente en órganos

reproductores (Lacouture, Lafront, Peillex, Pelletier, & Audet-Walsh, 2022). Por otro lado, la hipercolesterolemia (Pelton, Freeman, & Solomon, 2012), particularmente los altos niveles de LDL (Kok et al., 2011) y la obesidad (Allott, Masko, & Freedland, 2013) se han correlacionado con el riesgo desarrollar CaP y con acelerar su progresión a estados de mayor malignidad.

El cáncer de próstata puede estadificarse según el sistema TNM, de la American Joint Committee on Cancer (AJCC). Así, se establecen los siguientes niveles para la clasificación clínica del tumor según su localización:

- T1: El tumor no es perceptible al examen de tacto rectal (DRE) y no se observa durante la toma de imágenes. Es detectado habitualmente al realizar una cirugía por una hiperplasia benigna de la próstata:
- T2: El tumor se encuentra localizado únicamente en la próstata y por su tamaño es posible detectarlo por DRE.
- T3: El tumor ha crecido a través de la próstata hacia el tejido inmediatamente externo a la próstata.

- T4: El tumor crece hacia estructuras adyacentes a la próstata y diferentes las vesículas seminales como el esfínter externo, el recto, la vejiga o la pared pélvica.

Los tratamientos de CaP varían en función del estadio clínico-patológico del paciente y su condición general de salud. En estadios iniciales, T1 y T2 pueden adoptarse terapias clásicas como radiación; cirugía, o bien, espera vigilada. Sin embargo, en estadios superiores, T3 y T4, conocidos como CaP avanzado (MINSAL, 2015), se hace uso de una terapia más dirigida y específica como la orquiectomía parcial o total y tratamiento hormonal, puesto que el CaP es dependiente de los andrógenos Testosterona (T) y Dihidrotestosterona (DHT).

2.2 Papel del receptor de andrógenos en el desarrollo normal y anormal de la próstata.

El receptor de andrógenos (AR) es un factor de transcripción que se localiza en el citoplasma cuando se encuentra inactivo. Sus ligandos son los andrógenos Testosterona (T) y Dihidrotestosterona (DHT), los cuales en condiciones fisiológicas son producidos en su mayoría por las células de Leydig en el testículo y, en menor proporción por la corteza suprarrenal (Whitehead, 2001). La unión del receptor con su ligando forma el complejo andrógeno-AR, el cual promueve la heterodimerización del receptor y su traslocación nuclear para promover la expresión de genes diana involucrados en el crecimiento y desarrollo de la glándula prostática (Janne & Shan, 1991). De esta manera, la señalización mediada por andrógenos y su receptor es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la próstata (Vickman et al., 2020).

Desde el desarrollo fetal, tanto las células del estroma como del epitelio de la glándula prostática son dependientes de la presencia de testosterona. Durante la pubertad, la próstata experimenta un crecimiento acelerado, el cual está asociado a niveles elevados de testosterona propios de un individuo adulto, así como a la conversión de testosterona a

dihidrotestosterona, una molécula que posee mayor afinidad por AR y que promueve una señalización mediada por AR más intensa (Vickman et al., 2020). Este incremento en la señalización mediada por AR se ha relacionado con la regulación positiva de genes involucrados en la proliferación celular, tales como las ciclinas D1 y D3, y la regulación negativa de genes inhibidores del ciclo celular, como Retinoblastoma-1 (Nantermet et al., 2004).

En condiciones patológicas, el crecimiento anormal de la glándula prostática se asocia con la señalización andrógeno/AR. La evidencia muestra un desequilibrio a favor de la proliferación celular, lo que puede dar lugar a hiperplasia prostática benigna (BPH) o carcinoma prostático propiciado por la activación de AR mediante su ligando (Banerjee, Banerjee, Brown, & Zirkin, 2018). En este contexto, la señalización mediada por AR regula positivamente la expresión de genes de la fase M del ciclo celular, lo que promueve el desarrollo y crecimiento del cáncer de próstata andrógeno-independiente (AIPC) (Wang et al., 2009). Además, el gen del antígeno prostático específico (PSA), marcador bioquímico-clínico de la progresión del cáncer de próstata, está regulado al alza por AR a nivel transcripcional (Kim & Coetzee, 2004). En conjunto, la evidencia muestra que la señalización mediada por AR es clave para el desarrollo y progresión del cáncer de próstata.

2.3 Cáncer de próstata avanzado, tratamiento y resistencia a ADT.

Según la clasificación de estadios del Ministerio de Salud (MINSAL), el cáncer de próstata avanzado se define como estadio T4-N+M+, lo que indica que el cáncer se ha diseminado a nódulos linfáticos regionales y a otras partes del cuerpo. Debido a la dependencia hormonal del cáncer de próstata, en estos casos, la terapia de privación de andrógenos (ADT) u hormonoterapia se convierte en la primera opción de tratamiento (MINSAL, 2015).

La terapia de privación de andrógenos tiene como base la inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual es responsable de la producción de testosterona. La hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH) es secretada por el hipotálamo, y estimula la liberación de hormona luteinizante (LH) por la glándula pituitaria. La LH, a su vez, actúa sobre las células de Leydig en el testículo, las cuales generan el 95% de los andrógenos totales (Whitehead, 2001). La ADT consiste en una castración química, la cual se logra mediante el uso de agonistas o antagonistas de LH-RH. En ambos casos, se produce una disminución en la liberación de LH desde la glándula pituitaria, lo que genera una menor estimulación de las células de Leydig en el testículo y, por tanto, una disminución en la síntesis de testosterona a nivel testicular.

Aunque la mayoría de los casos de cáncer de próstata responden positivamente a la terapia de privación de andrógenos (ADT), que consiste en reducir hasta un 95% los niveles de andrógenos en sangre, un porcentaje de entre el 10% y el 20% de los pacientes con cáncer de próstata sensible a hormonas desarrollará resistencia al tratamiento en un plazo de 3 a 5 años, lo que se conoce como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). (Mansinho, Macedo, Fernandes, & Costa, 2018). Además, el 44% de los pacientes con CaP metastásico no reciben ADT debido a la presencia de resistencia intrínseca a la castración (National Cancer Institute, 2010)

Como se mencionó, a pesar de que la terapia de privación de andrógenos es el tratamiento preferente para el CaP avanzado, en un alto porcentaje de los casos la terapia falla, lo que hace que la mayoría de los casos de CaP progresen hacia CRPC. Clínicamente, el CRPC se define por el aumento progresivo de los niveles séricos del biomarcador tumoral de CaP, el antígeno prostático específico (PSA) o la progresión metastásica de tumores, a pesar de que los niveles de testosterona sérica sean menores a los 50 ng/dL (Crona & Whang, 2017).

2.4 CRPC y dependencia de la señalización de andrógenos.

Una de las características más destacables del CRPC es la reactivación de la señalización andrógenos/AR (Stoykova & Schlaepfer, 2019), lo que se refleja clínicamente en el aumento de los niveles séricos del PSA, un marcador bioquímico regulado por AR a nivel transcripcional. Por lo tanto, lo que se conocía anteriormente como cáncer de próstata andrógeno-independiente (AIPC), hoy en día se define como cáncer de próstata resistente a la castración dependiente de andrógenos.

Además, existe evidencia de que un alto porcentaje de pacientes con CRPC presenta un aumento en el número de copias de genes *AR*, y cerca del 30% de los pacientes presenta una elevación en los niveles de transcripción de genes asociados con AR (Banerjee et al., 2018). Estos hallazgos confirman la relación de dependencia entre la señalización mediada por AR y el desarrollo de CRPC, en el que AR está involucrado en la regulación positiva de genes relacionados con la proliferación y la supervivencia celular, como *CDC20*, *UBE2C* y *CDK1* (Wang et al., 2009) , así como en la metástasis y la baja supervivencia del paciente, como IL-6 (Grivennikov & Karin, 2010; Lonergan & Tindall, 2011) .

En consecuencia, la señalización recurrente mediada por AR después del tratamiento con ADT se ha relacionado con el fallo de la terapia farmacológica y la progresión de CRPC (Cao et al., 2014).

2.5 Mecanismos de resistencia a terapia de privación de andrógenos y esteroidogénesis intracrina de andrógenos

La literatura describe múltiples mecanismos propuestos para la resistencia a la castración en CaP, incluyendo la sobreexpresión de AR, la generación de mutantes que conducen a la promiscuidad del receptor o la expresión de variantes de empalme, como AR-V7 y AR567 (Sprenger & Plymate, 2014). Estas variantes presentan falta o modificaciones en su dominio de unión a ligando (LBD), lo que las hace activas de manera constitutiva y se ha asociado su expresión con la progresión de CRPC.

Otros mecanismos de resistencia a la castración incluyen la activación de vías de señalización aberrantes dependientes de ligando, como MAPK, AKT, NF- κ B y STAT3, que son algunas de las principales vías descritas en la progresión del CaP y el desarrollo del CRPC (Abdulghani et al., 2008; Shorning, Dass, Smalley, & Pearson, 2020; Suh & Rabson, 2004; Zhang et al., 2009). Estas vías promueven la expresión de AR y su activación por fosforilación independiente de ligandos, además de la expresión de genes involucrados en la proliferación y

supervivencia de células de CaP (Ghosh, Malik, Bedolla, & Kreisberg, 2003; Gioeli, Mandell, Petroni, Frierson, & Weber, 1999; Ismail, Lessard, Mes-Masson, & Saad, 2004).

También, se ha descrito un aumento en la producción de DHT en tejidos periféricos (Isaacs & Coffey, 1981). DHT es un ligando de alta afinidad por AR. De hecho, DHT posee una mayor afinidad por el receptor que T (Grino, Griffin, & Wilson, 1990). Esto permite su activación a pesar de su baja disponibilidad, lo que favorece el crecimiento y la supervivencia celular de las células de CaP en condiciones de castración.

Sumado a esto, se ha observado que las células de CaP, las cuales provienen de un órgano no esteroideogénico (células epiteliales prostáticas) generan un cambio fenotípico hacia la síntesis intracrina de esteroides, como T y DHT. Este es un mecanismo relevante en la generación de CRPC dependiente de la activación de AR y se conoce como esteroideogénesis intracrina (o intratumoral). La esteroideogénesis intracrina corresponde a una serie de reacciones enzimáticas que permiten la generación de andrógenos T y DHT *de novo* a partir del colesterol en las células de CRPC (Chandrasekar, Yang, Gao, & Evans, 2015) (Figura 1).

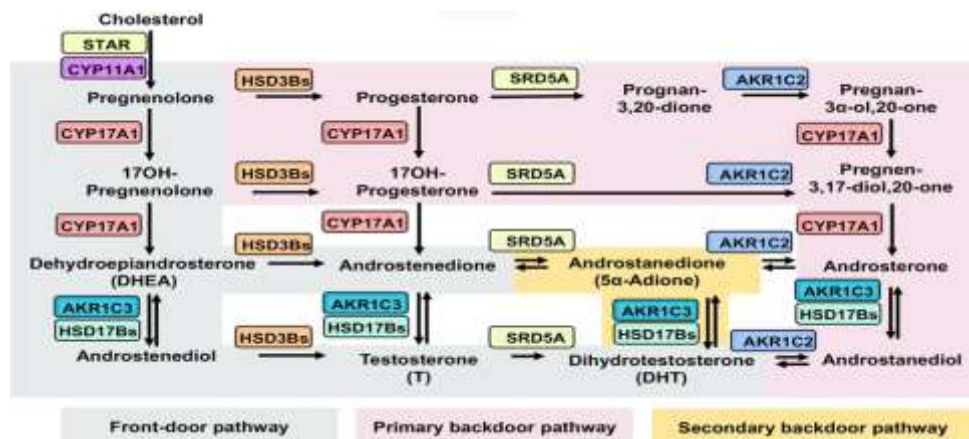


Figura 1.

Figura 1. Vías esteroidogénicas generales en el CPRC. Se han definido tres vías principales para la síntesis de dihidrotestosterona (DHT) en el CPRC. En la vía frontal, caracterizada por la necesidad de testosterona (T) como precursor esencial de la DHT, la pregnenolona se convierte en dehidroepiandrosterona (DHEA) mediante la actividad hidroxilasa y liasa secuencial de CYP17A1. La DHEA (de origen intrínseco o suprarrenal) es entonces metabolizada por la 3 β -HSD para dar lugar a androstenediona o por la 17 β -HSD (o AKR1C3) para dar lugar a androstenediol, que posteriormente se convierten en T, seguida de su 5 α -reducción a DHT por las 5 α -reductasas (SRD5As). Por otro lado, las vías de puerta trasera se refieren al uso de diferentes sustratos y reacciones enzimáticas para sintetizar DHT, evitando la T como intermediario. En la vía de puerta trasera primaria, los intermediarios de la progesterona son reducidos en 5 α y 3 α por SRD5A y AKR1C2 sobre la actividad liasa de CYP17A1, formando androsterona y luego a androstanediol por 17 β -HSD para generar DHT. En la vía secundaria de puerta trasera (o vía 5 α -diona), la androstenediona producida en la vía clásica es convertida a 5 α -androstenediona (5 α -Adione) por SRD5As en lugar de ser convertida a T, y luego a DHT por 17 β -HSD's. Observe que la enzima CYP17A1, blanco terapéutico del fármaco abiraterona posee una función determinante en la esteroidogénesis intratumoral, pues, participa de las tres vías de la esteroidogénesis. sSTAR (proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis); CYP11A1 (enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol); CYP17A1 (esteroide 17 α -monooxigenasa); AKR1C3 (aldo-ceto reductasa 1C3); 17 β -HSD s, (17B-hidroxiesteroide deshidrogenasas); 3 β -HSD's (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas); SRD5As (5 α -esteroide reductasa); AKR1C2 (aldo-ceto reductasa 1C2). Modificado de Orphan nuclear receptors as regulators of intratumoral androgen biosynthesis in castration-resistant prostate cancer. Jianfu Zhou, Et. Al. Oncogene. 2021 (Zhou et al., 2021).

En general, se han definido tres vías para la síntesis de DHT en CRPC. La primera vía, conocida como la vía de puerta frontal, involucra la esteroidogénesis a partir del colesterol que ingresa a la mitocondria a través de la enzima reguladora de esteroidogénesis (sSTAR), seguida de la acción de la enzima citocromo P450 familia 11 subfamilia 1 (CYP11A1), que produce pregnenolona. La segunda vía implica la síntesis de DHT a partir de progesterona y, finalmente, la tercera vía se refiere a la síntesis de DHT a partir de androstanediona, la cual puede ser obtenida a partir de dehidroepiandrosterona (DHEA) o androsterona. Estas dos últimas vías son conocidas como las vías de puerta trasera, ya que no requieren de T para la síntesis final de DHT.

La vía de puerta frontal para la generación de andrógenos inicia con la síntesis de pregnenolona a partir del colesterol, mediada por las enzimas sSTAR y CYP11A1. La pregnenolona puede derivar en dos rutas, una de ellas mediada por CYP17A1 para la síntesis de DHEA, la cual se transforma en androstanediol y luego en testosterona y, finalmente, en DHT por la acción de la enzima 5 α -reductasa. En contraposición, la primera vía de puerta trasera se inicia con la generación de progesterona a partir de pregnenolona mediada por la enzima 3 β -HSD. Este metabolito se transforma en androsterona, la cual se metaboliza en androstanediol y, finalmente, en DHT por la acción de AKR1C2. La segunda vía de puerta trasera determina la generación de androstanediona a partir de dos

precursores. Todos estos procesos son mediados por tres enzimas clave: CYP17A1, 3 β -HSD y 5 α -reductasa.

La enzima CYP17A1 es esencial en las primeras etapas de la androgénesis y limita la producción de DHT en las tres vías. En células de CRPC, se ha demostrado un aumento en la expresión de esta enzima esteroidogénica en varios estudios. Por ejemplo, en modelos murinos de xenoimplantes de células de cáncer de próstata que desarrollan CRPC (Cai et al., 2011). Además, en otro estudio en modelos murinos de CRPC, se encontró un aumento en los niveles de transcrito para las enzimas CYP17A1 y 17 β -HSD (Knuuttila et al., 2014). Estos hallazgos concuerdan con la sobreexpresión de CYP11A1, la enzima que media el paso de colesterol a pregnenolona, así como con la sobreexpresión de sTAR, una enzima ayudante que media el influjo de colesterol hacia la mitocondria para iniciar la androgénesis. Además, se ha observado un aumento en la expresión de 3 β -HSD en modelos celulares de CRPC y sobreexpresión de 5 α -reductasa y 3 β -HSD en modelos animales.(Dillard, Lin, & Khan, 2008).

Más específicamente, los estudios basados en una metodología sensible en la medición de la concentración metabolitos, como el publicado por Mohler y colaboradores, demostraron que, aunque los niveles de DHT son bajos en el

tejido derivado de CRPC en comparación con el tejido normal, son suficientes para activar los AR en líneas celulares de CRPC como CWR-R1 y LNCaP-C4-2. Además, en estos mismos modelos, se ha observado una mayor sensibilidad a los efectos pro-crecimiento de DHT, incluso cuando se tienen concentraciones menores a las requeridas por la línea celular de CaP, LNCaP, para su crecimiento dependiente de DHT (Gregory, Johnson, Mohler, French, & Wilson, 2001).

Además, estudios más recientes han demostrado un aumento en los niveles intratumorales de DHT después de un tratamiento de privación de andrógenos en comparación con los niveles precastración en modelos *in vivo* de ratones xenoimplantados con la línea celular LNCaP (Xiao et al., 2018) En adición, se ha descubierto que en pacientes con CRPC, los niveles de andrógenos intraprostáticos son más altos en comparación con los niveles séricos de andrógenos correspondientes a la castración (Cai et al., 2011). Toda esta evidencia refuerza la idea de que la síntesis intratumoral o intracrina de andrógenos es un mecanismo clave en el desarrollo de CRPC.

2.6 Vías de obtención de colesterol, estrés oxidativo y su asociación con resistencia a la castración en cáncer de próstata.

Los andrógenos son sintetizados a partir del esqueleto de la molécula de colesterol, este, a su vez es obtenido por las células de cáncer de próstata de manera endógena por la vía del mevalonato (MVA), o bien desde la captación de lipoproteínas desde el extracelular.

La fuente endógena de colesterol es obtenida a través de la MVA, que utiliza acetil-CoA que deriva del metabolismo de la glucosa y algunos otros metabolitos como glutamina o acetato, que permiten producir esteroides como el colesterol. Esta vía comienza con la síntesis de acetoacetil-CoA a partir de dos moléculas de acetil-CoA, mediada por la enzima Acetil-coenzima A acetiltransferasa (ACAT2). Posteriormente, la hidroximetilglutaril CoA sintasa (HMGCS1) cataliza la síntesis de HMG-CoA, molécula que es reducida por acción de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCR) a mevalonato. Esta es la reacción limitante para la síntesis final de colesterol que puede ser usado en la síntesis de hormonas esteroideas. Las cuales, como se mencionó anteriormente, promueven la progresión de cánceres dependientes de hormonas, como el cáncer de próstata.

Se ha reportado que en CaP existe una desregulación al alza de proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), factores de transcripción que regulan la expresión de HMGCR (Mullen, Yu, Longo, Archer, & Penn, 2016). Por esta razón, los inhibidores de la MVA como las estatinas (inhibidores de HMGCR), han sido estudiadas por su posible efecto terapéutico. En ese sentido, el uso de estatinas en células LNCaP-C81, un modelo de CRPC, genera disminución significativa del crecimiento celular en relación con el control (Miller et al., 2017). En el mismo estudio, se observó que el uso combinado de estatinas con el fármaco abiraterona, un inhibidor de la síntesis de andrógenos, generó una baja en la tasa de crecimiento celular en comparación con la administración de cada fármaco por sí solo. El efecto sinérgico de simvastatina y abiraterona se debe a una supresión del eje andrógeno-AR debido a una inhibición de la esteroidogénesis, mediante el bloqueo de CYP17A1 y una disminución en los niveles de colesterol para la esteroidogénesis *de novo*.

Por otro lado, en un estudio *in vitro* donde se usó como modelo de CRPC la línea celular 22RV1 tratado con simvastatina, mostró que, si bien las células disminuyen su proliferación, no existen diferencias significativas en los niveles transcripcionales de los genes positivamente regulados por AR, *PSA* y *KLK2*. En el mismo estudio, se realizaron xenoinjertos con células de la línea 22RV1 en ratones inmunosuprimidos castrados y tratados con simvastatina y darolutamida (un inhibidor de AR). Los resultados mostraron que existe un menor crecimiento

tumoral en el grupo tratado con simvastatina y darolutamida, mientras que no se encontraron diferencias significativas en los tamaños de los tumores de los grupos tratados con simvastatina o darolutamida por separado con respecto al control (Nakayama et al., 2022) Estos hallazgos sugieren que el efecto de simvastatina en la disminución de la generación de colesterol *de novo* para la esteroidogénesis de células de CRPC *in vitro* e *in vivo* es menor en comparación a otras formas de activación de AR.

Por otro lado, la fuente exógena de colesterol se refiere a su obtención desde el extracelular, la cual se logra mediante la captación de lipoproteínas que se clasifican según su densidad en: quilomicrones (ULDL); lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). En particular, la LDL es la encargada de la entrega de colesterol exógeno a los tejidos periféricos del organismo, en un proceso mediado por el receptor de LDL (LDLR), el cual reconoce a la apolipoproteína B100 (Apo B100), el único componente proteico de la LDL. Así, se ha descrito que el 75% del colesterol sérico es incorporado mediante la endocitosis mediada por el receptor de LDL receptor (Yang et al., 2020).

En otra arista, el microambiente tumoral se ha descrito como pro-oxidante debido a la alta presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que se ha asociado a un ambiente pro-tumorigénico y pro-crecimiento de células tumorales (Weinberg, Ramnath, & Negrath, 2019). Particularmente, se ha descrito al estrés oxidativo como una característica propia del cáncer de próstata y se le ha asociado al desarrollo de un fenotipo agresivo de CaP en estudios *in vitro*, usando líneas celulares de CaP, DU145 y LNCaP.(Kumar et al., 2008)

En el contexto del metabolismo lipídico, el estrés oxidativo que se produce en el microambiente tumoral podría modificar a las lipoproteínas mediante la lipoperoxidación, lo que las oxida y les confiere una carga neta negativa. Esto, teóricamente, podría limitar la captación de colesterol exógeno a través de receptores de LDL y, por tanto, la función de los receptores *scavenger* de lipoproteínas modificadas podría ser relevante para incorporar colesterol exógeno. Este colesterol captado desde el extracelular es fundamental para la esteroidogénesis y, por consiguiente, para el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales. Esta hipótesis es apoyada por evidencia de que los receptores *scavenger*, como LOX-1 y SR-B1, mediante los cuales se genera la endocitosis de lipoproteínas modificadas, se encuentran sobre-expresados en CRPC y la expresión del receptor de LDL se encuentra disminuida en CaP avanzado. (Cáceres, 2022; Gonzalez-Chavarria et al., 2018; Traugber et al., 2020).

Un estudio reciente resume lo expuesto anteriormente al mostrar que en un modelo celular de CaP tratado crónicamente con enzalutamida, un inhibidor competitivo del receptor de andrógenos, disminuye la síntesis endógena de colesterol por MVA y aumenta la captación de colesterol extracelular mediante LDL modificada en función del tiempo de tratamiento (Tousignant et al., 2020). Esto sugiere que las células CRPC tienen un mecanismo de compensación al incorporar colesterol para la producción de esteroides intratumorales, con el fin de suplir los requerimientos de andrógenos necesarios para la activación del receptor de andrógenos (AR). Por lo tanto, la incorporación de colesterol a través de LDL oxidada puede desempeñar un papel importante en la esteroidogénesis intratumoral.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

El cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) y la progresión del fenotipo CRPC depende de la síntesis intratumoral o intracrina de andrógenos. Dado que la esteroidogénesis intratumoral corresponde a una serie de reacciones enzimáticas, se requiere de dos factores determinantes para su generación: 1) la disponibilidad del sustrato inicial, el colesterol y 2) la expresión de enzimas esteroidogénicas que medien las reacciones de síntesis. Este segundo factor se podría ver afectado por mecanismos de retroalimentación positiva, es decir, una mayor disponibilidad del sustrato puede generar una mayor expresión en las enzimas para su procesamiento. Por otro lado, las lipoproteínas de baja densidad corresponden a la principal fuente de colesterol para las células de CaP. Sin embargo, la contribución de las lipoproteínas de baja densidad nativas y oxidadas a la esteroidogénesis intratumoral no ha sido completamente estudiada.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la contribución de las lipoproteínas de baja densidad nativas y oxidadas en la expresión de enzimas esteroideogénicas y marcadores de progresión de CRPC en células de cáncer de próstata resistente a la castración?

5. HIPÓTESIS

Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) contribuyen significativamente al desarrollo del fenotipo CRPC mediante la expresión de enzimas esteroideogénicas y marcadores de progresión en células de CRPC *in vitro*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General.

Analizar la contribución de las lipoproteínas de baja densidad nativas y oxidadas en la esteroidogénesis intratumoral y la progresión de células de CRPC *in vitro*.

6.2. Objetivos específicos.

6.2.1 Objetivo específico 1.

Determinar el efecto de las lipoproteínas de baja densidad nativas y oxidadas en la expresión de enzimas clave para la esteroidogénesis intratumoral CYP17A1, 17 β -HSD y 3 β -HSD y 5 α -Reductasa, en las líneas celulares de CRPC, 22RV1 y C4-2B.

6.2.2 Objetivo Específico 2.

Determinar el efecto las lipoproteínas nativas y oxidadas en la expresión de marcadores de resistencia a ADT y progresión de CRPC: AR, AR-V7 y PSA, en las líneas celulares de CRPC, 22RV1 y C4-2B.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Cultivo celular.

Las líneas celulares LNCaP, C4-2B y 22RV1 se obtuvieron desde *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Md.).

LNCaP. La línea celular de cáncer de próstata humana LNCaP es dependiente de andrógenos y representa un estadio previo al CRPC. Fue obtenida desde un aislado de ganglio linfático supraclavicular con evidencia de metástasis de carcinoma prostático de un paciente caucásico de 62 años. Esta línea se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1% y L-glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos de esta línea celular se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO₂ al 5%.

Línea celular C4-2B: La línea celular humana C4-2B fue aislada a partir de metástasis óseas de xenoinjertos ortotópicos prostáticos de células de C4-2 en ratones *Nude* castrados, las cuales, a su vez, derivan de la línea celular LNCaP y es ampliamente utilizada en el estudio de CRPC y esteroidogénesis intratumoral. Esta línea celular se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con

suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1% y L-glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO₂ al 5%.

Línea celular 22RV1: Esta línea celular es una línea celular epitelial de carcinoma de próstata humano, derivada del xenoimplante de células CWR22 en ratones *Nude* castrados. Al igual que C4-2B, es un modelo CRPC ampliamente utilizado en el estudio de CRPC y la esteroidogénesis intratumoral. El cultivo se realizó en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina-estreptomicina al 1% y L-glutamina 2 mM. (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos de la esta línea celular se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado con CO₂ al 5%.

7.2 Tratamiento de los cultivos celulares con LDL nativa y oxidada para el análisis de expresión de enzimas claves de la esteroidogénesis.

Se cultivaron 500.000 células de las líneas celulares CRPC 22RV1 y C4-2B en placas de 12 pocillos. Para simular las condiciones de privación de andrógenos, las células fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640, 1% penicilina-estreptomicina y suplementado con 10 % de suero bovino fetal libre de hormonas (*charcoal-stripped*) por 72 horas previas al tratamiento. Luego, las células fueron tratadas con 50 µg/mL de LDL nativa u oxidada (obtenida desde

ThermoFisher Scientific USA) en un volumen de 500 μ L de medio RPMI 1640 con 2.5 %. Suero Bovino Fetal *charcoal-stripped*.

Como control negativo (control sin LDL oxidada o sin LDL nativa) se utilizaron 500 μ L de medio RPMI 1640 con 2.5 %. Suero Bovino Fetal *charcoal-stripped* reemplazando el volumen correspondiente de LDL nativa u oxidada con PBS.

7.3 Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas se utilizó RIPA Lysis Buffer System ® (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó una solución de 25 mM Tris-HCl; pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, suplementada con inhibidores de proteasas. La solución fue agregada a cada uno de los pocillos con células con y sin tratamiento y se dejó incubar por 10 minutos en hielo. Los lisados celulares fueron extraídos desde la placa y se centrifugaron por 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes con las proteínas en suspensión fueron inmediatamente almacenados a -20°C.

Las proteínas fueron cuantificadas mediante el Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce (ThermoFisher Scientific, USA), según el protocolo del fabricante y

la absorbancia fue medida a 526 nm en el espectrofotómetro SYNERGY HTX Multimode Reader (Biotech, Germany).

7.4 Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes y análisis por Western Blot.

Se sembraron 30 µg de proteínas totales en un gel al 10% acrilamida-Bis acrilamida y se resolvieron a 100 voltios. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µM mediante transferencia húmeda a 100 voltios por 90 minutos.

Las membranas se bloquearon por 1 hora con leche descremada al 5 % (p/V) en TBS 50mM, previo secado a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, las membranas fueron incubadas por 16 horas con el respectivo anticuerpo primario anti CYP17A1, 3β-HSD, 17β-HSD y 5α-Reductasa, para el cumplimiento del Objetivo específico 1 y un anticuerpo primario anti-AR o AR-V7, para el cumplimiento del Objetivo específico 2 (los anticuerpos se detallan en la Tabla 1). Los anticuerpos fueron preparados en leche descremada al 2,5% p/V en buffer TBS 50 mM, Tween-20 al 0,01%.

Finalmente, las membranas fueron lavadas con buffer TBS 50 mM, Tween-20 al 0.001% y SDS 0,1% y se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario

por 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la Tabla 2.

Los Western Blot fueron revelados con el fotodocumentador infrarrojo Odissey CLX, LICOR (Texas, EE. UU.) y la cuantificación de la fluorescencia de las bandas se realizó mediante el software LICOR Image Studio V5.2.5.

7.5 Ensayo de viabilidad celular.

Con el objetivo de evaluar el efecto de las lipoproteínas nativas y oxidadas sobre la viabilidad celular y el desarrollo de un fenotipo CRPC, se procedió a realizar un ensayo viabilidad celular en la línea celular de CaP, LnCaP, en condiciones de privación de andrógenos.

En una placa de 96 pocillos, se cultivaron 5000 células por pocillo en medio RPMI suplementado con 2,5% de Suero Bovino Fetal *charcoal-stripped*. Las células se trataron con 10 nM de DHT y 50 µg/mL de LDL nativa u oxidada según corresponda.

Luego de 72 horas, las células fueron fijadas con etanol al 75% y se tiñeron con cristal violeta al 0,1%. La medición de la emisión de fluorescencia infrarroja se midió a 790 nm mediante el fotodocumentador infrarrojo Odissey CLX, LICOR

(Texas, EE. UU.). La cuantificación de la fluorescencia de los pocillos se realizó mediante el software LICOR Image Studio V5.2.5.

7.6 Análisis de la traslocación nuclear de AR por inmunocitoquímica.

Para visualizar la localización de AR se realizó un ensayo de inmunocitoquímica en células C4-2B y 22RV1.

Se cultivaron 100×10^3 células de cada línea celular sobre vidrios tratados previamente con 200 μ L de Poli-L-lisina al 0,01 %, en placas de 24 pocillos. Las células se cultivaron hasta una confluencia del 60% en los medios descritos anteriormente y luego se trataron con 50 μ g/mL de LDL oxidada en medio RPMI por 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron con 300 μ L de PBS 1X, dos veces, y se les adicionó 300 μ L de solución fijadora de paraformaldehído al 4 % y se dejó incubar por 30 minutos a 37°C. Las células se lavaron dos veces con PBS 1x, se adicionaron 300 μ L de Tritón-x100 al 1 % y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron nuevamente lavadas con PBS 1X y se incubaron con 300 μ L de BSA al 1% por 30 minutos a temperatura ambiente.

Luego, se adicionaron 30 μ L de anticuerpo primario anti-AR preparado en BSA al 1% p/V y se incubó por 16 horas a 4°C. Por último, se realizó el lavado con PBS 1X, y se dejó incubar con anticuerpo secundario anti Rabbit-FITC por 4 horas a 4°C. Finalmente, se incubó con DAPI por 3 minutos. Los vidrios fueron montados con medio de montaje en portaobjetos y las imágenes fueron

adquiridas con el microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 31 a un aumento de 60X y analizadas mediante el software Fiji ImageJ 1,53c, National Institutes of Health, USA.

7.7 PCR en tiempo real.

La cuantificación por PCR del antígeno prostático específico (PSA) se realizó utilizando el KAPA one step SYBR® FAST qPCR KIT (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) y el termociclador Agilent AriaMx real-time PCR system. y los resultados se analizaron como cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los valores del ciclo umbral se normalizaron con el gen interno β -actina. Los partidores utilizados se detallan en la Tabla 3.

7.8 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en los diferentes experimentos fueron graficados y analizados utilizando el software Graphpad Prism 9.0.2. Los análisis estadísticos de los datos se realizaron mediante las pruebas *t-Student* para comparaciones entre dos grupos y ANOVA para comparaciones múltiples con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la detección y cuantificación de enzimas esteroidogénicas y marcadores de progresión de CRPC.

Anticuerpo	Proveedor	Código	Especie	Tipo	Título
Anti CYP17A1	Santa Cruz Biotechnology	sc-518007	Ratón	Monoclonal	1/500
Anti 17 β -HSD (AKR1C3)	Santa Cruz Biotechnology	sc-373902	Ratón	Monoclonal	1/500
Anti 3 β -HSD	Santa Cruz Biotechnology	sc-515120	Ratón	Monoclonal	1/500
Anti 5 α -Reductasa	Santa Cruz Biotechnology	sc-293232	Ratón	Monoclonal	1/500
Anti-AR	Santa Cruz Biotechnology	sc-13062	Conejo	Policlonal	1/1000
Anti-AR-V7	Abcam	ab198394	Conejo	Monoclonal	1/1000
Anti GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724	Ratón	Monoclonal	1/1000
Anti Alfa Tubulina	Santa Cruz Biotechnology	sc-5286	Ratón	Monoclonal	1/1000

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot e inmunocitoquímica.

Anticuerpo	Proveedor	Código	Especie	Tipo	Título
Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor® 790	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	715655150	Burro	Policlonal	1/10000
Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor® 680	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	715625150	Burro	Policlonal	1/10000
Anti-IgG de conejo (H+L) Alexa Fluor® 680	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	711625152	Burro	Policlonal	1/10000
Anti RbFITC	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	65-6111	Cabra	Policlonal	1/1000

Tabla 3: Partidores utilizados para PCR en tiempo real.

Gen	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
PSA	5'-TGTACCCTGGCATTGCCGACAG-3'	5'-ACGGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3'.
β -actina	5'- GCATTACCGGAAGTGGATCAAGGA-3',	5'- TTGAGTCTTGGCCTGGTCATTTCC-3'.

8.-RESULTADOS

8.1 Lipoproteína de baja densidad oxidada genera un aumento significativo en la expresión de enzimas clave en la esteroidogénesis.

Nuestros resultados indican que el tratamiento con 50 µg/mL de LDL oxidada produce un incremento significativo en la expresión de la enzima CYP17A1 en células CRPC, en comparación con las células sin tratamiento. Este aumento es de 3,1 veces para la línea celular 22RV1 y 1,6 veces para la línea C4-2B. En contraste, el tratamiento con 50 µg/mL de LDL nativa no genera cambios significativos en la expresión de CYP17A1 en ninguna de las líneas celulares de CRPC (Figura 2).

En resumen, se demuestra que la forma oxidada de la LDL, y no la LDL nativa, favorece la sobreexpresión de CYP17A1 en células CRPC, lo cual es de especial importancia debido a que la sobreexpresión de esta enzima se relaciona con el desarrollo y progresión del CRPC a través de la esteroidogénesis intracrina o intratumoral (Chandrasekar et al., 2015; Mostaghel et al., 2011)

Además, estos hallazgos establecen una relación entre la forma oxidada de la LDL y la enzima clave en la esteroidogénesis, CYP17A1, que es el blanco

molecular de la Abiraterona, un fármaco de nueva generación utilizado para el tratamiento del CRPC y cuyo mecanismo de acción consiste en disminuir la esteroidogénesis intratumoral (Mostaghel et al., 2011).

En conjunto, nuestros datos representan una contribución significativa a la investigación del CRPC, al abrir nuevas áreas de estudio en la resistencia a la terapia con Abiraterona y en los posibles mecanismos de resistencia relacionados con la esteroidogénesis intratumoral y su conexión con el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad.

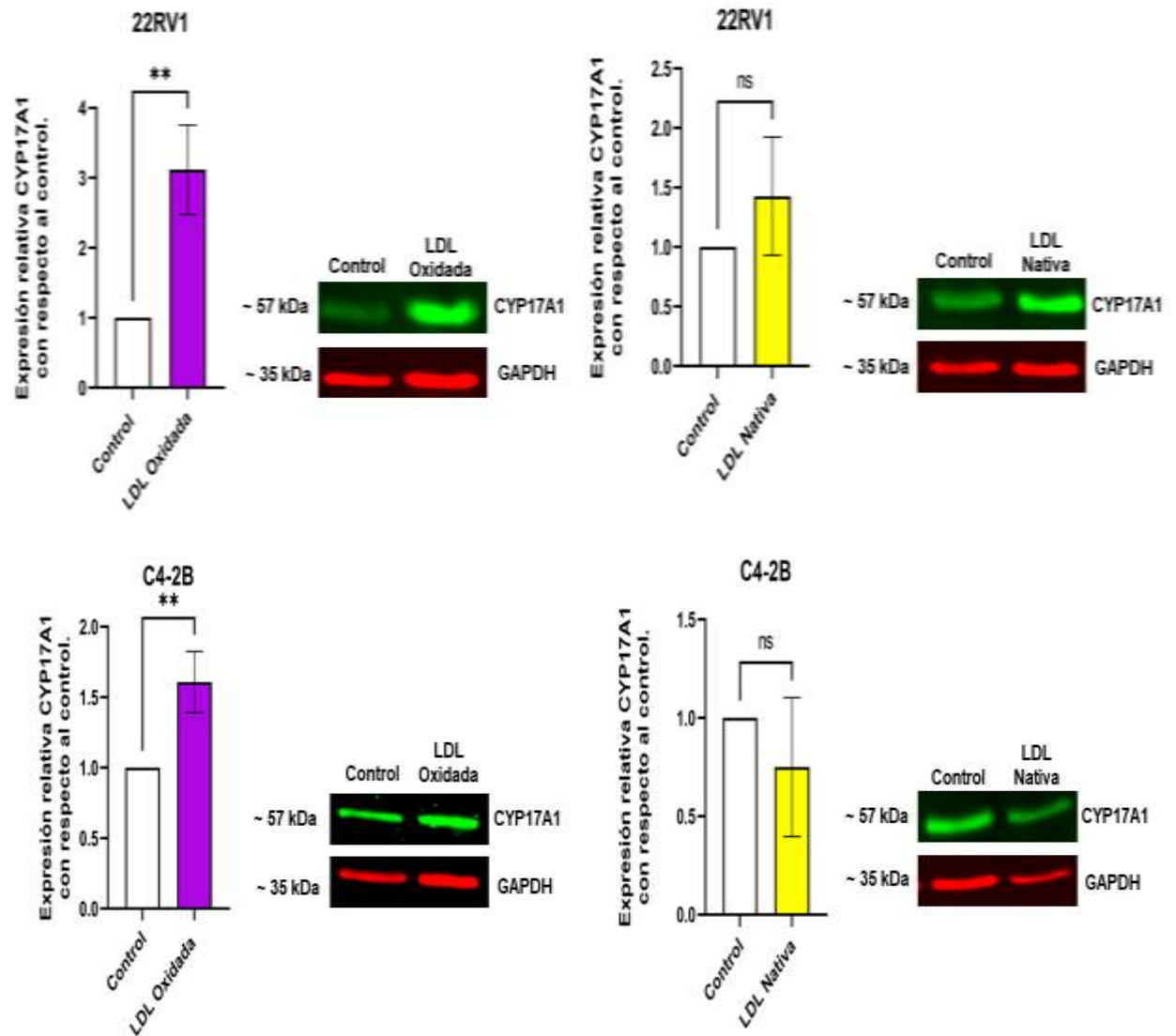


Figura 2. Expresión relativa de la enzima CYP17A1 respecto al control sin tratamiento. Las líneas 22RV1 y C4-2B fueron tratadas con 50 µg/mL de LDL oxidada o nativa y la expresión de CYP17A1 fue analizada a través de Western Blot. Las fluorescencias de cada banda fueron analizadas mediante el software Image Studio Lite y se evaluó la significacancia estadística mediante la prueba *t-Student* ($p \leq 0,05$), $n=3$. (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Al evaluar la expresión de la enzima 3 β -HSD (AKR1C1), se observó que el tratamiento con 50 μ g/mL de LDL oxidada no produjo cambios significativos en su expresión, mientras que el tratamiento con 50 μ g/mL de LDL nativa en la línea celular de CRPC 22RV1 aumentó la expresión de la enzima. Es importante destacar que se requiere un mayor número de réplicas en ambos casos para confirmar la tendencia y la significancia estadística. Por otro lado, en la línea celular C4-2B, tanto el tratamiento con 50 μ g/mL de LDL oxidada como con 50 μ g/mL de LDL nativa produjo un aumento significativo en la expresión de la enzima de 1,22 y 1,11 veces, respectivamente (Figura 3).

Cabe destacar que la enzima 3 β -HSD es una enzima esteroideogénica que participa en la síntesis de DHT mediante las vías de puerta frontal y trasera. En este sentido, nuestros resultados son relevantes en el contexto clínico, ya que una mayor expresión de la enzima en la célula CRPC indica una mayor actividad esteroideogénica. Estos hallazgos apoyan el uso de 3 β -HSD como un posible blanco farmacológico para el tratamiento de la patología, tal como sugieren algunos estudios previos (Chang et al., 2013; Evaul, Li, Papari-Zareei, Auchus, & Sharifi, 2010; Li et al., 2012)

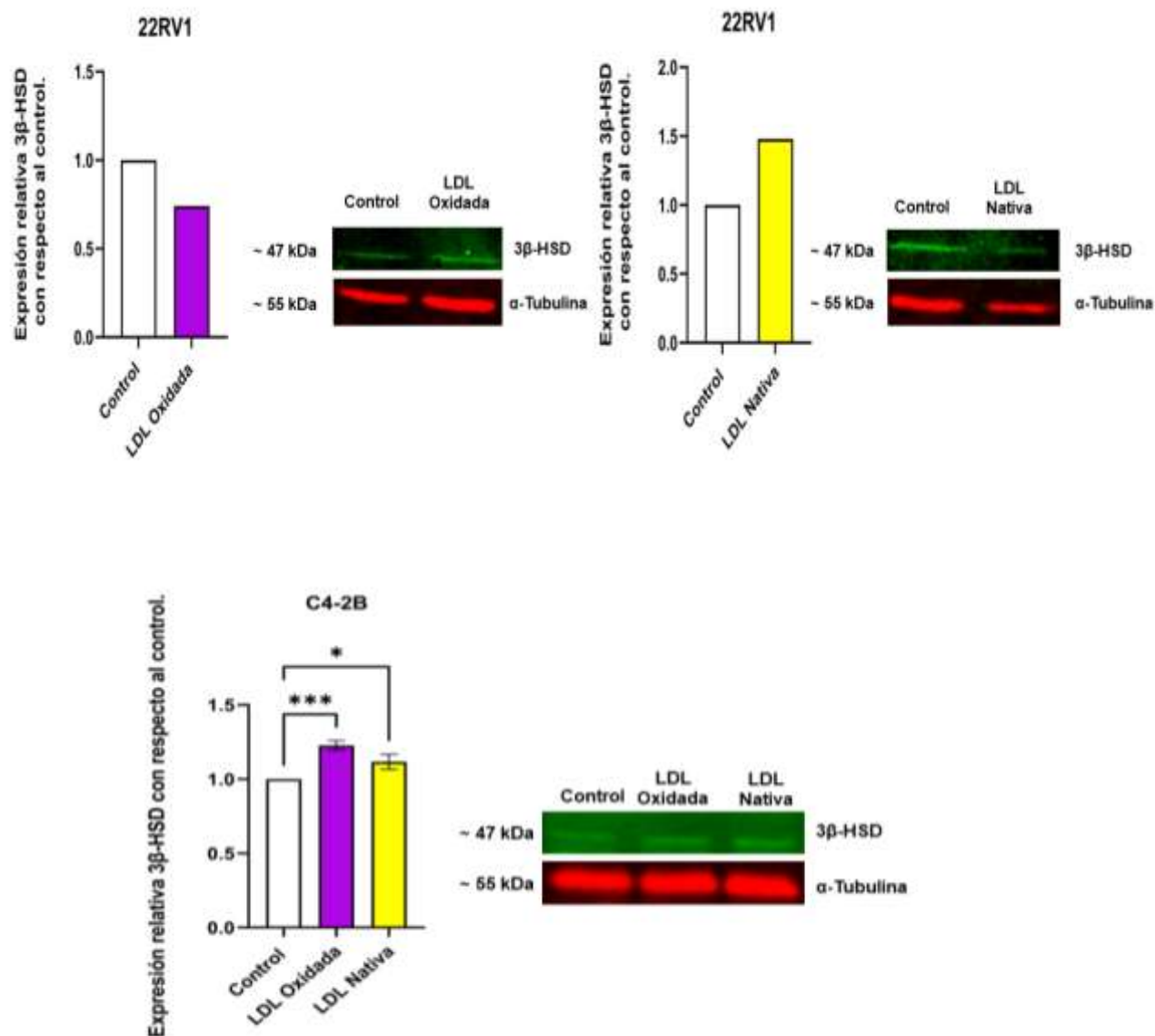


Figura 3. Expresión relativa de la enzima 3β-HSD respecto al control sin tratamiento. Las células de las líneas de CRPC 22RV1 y C4-2B fueron tratadas con 50 µg/mL de LDL nativa u oxidadaoxidada o nativa y la expresión de 3β-HSD fue analizada a través de Western Blot. Las fluorescencias de cada banda fueron analizadas mediante el software Image Studio Lite. Para la línea celular C4-2B se evaluó la significancia estadística mediante la prueba ANOVA ($p \leq 0,05$), $n=3$ (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ de LDL oxidada no genera cambios significativos en la expresión de la enzima 17 β -HSD en las líneas celulares de CRPC 22RV1 y C4-2B (Figura 4). Sin embargo, el tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ de LDL nativa genera una disminución significativa en la expresión de la enzima en las células de CRPC de la línea 22RV1, mientras que para la línea C4-2B no se observa una variación significativa en su expresión.

La enzima 17- β -HSD desempeña un papel clave en la síntesis de andrógenos, ya que cataliza los pasos finales de la conversión de androstenediona en dihidrotestosterona en las rutas de androgénesis de puerta frontal y trasera (Labrie et al., 1997). Su acción es clínicamente relevante para el desarrollo y progresión del CRPC, ya que su expresión se relaciona con la resistencia a terapias que tienen como objetivo el AR, como la abiraterona o Enzalutamida. Esta resistencia se produce mediante un aumento en la expresión de la variante independiente de ligando AR-V7 (Liu et al., 2019) pero también mediante un incremento de la esteroidogénesis intratumoral que media esta enzima (Zhao et al., 2019)

Por lo tanto, aunque nuestros resultados no muestran un aumento en la expresión de la enzima 17 β -HSD en respuesta al tratamiento con oxLDL, para ambas líneas celulares, su análisis sigue siendo importante en la patología del

CRPC, ya que algunos estudios han relacionado su sobreexpresión con la resistencia a terapias no hormonales, como la terapia de radiación (Sun et al., 2016). En síntesis, aun cuando nuestros resultados no muestran una relación entre el aumento de la esteroidogénesis por la sobre expresión de 17β -HSD y lipoproteínas de baja densidad, su análisis de expresión puede ser un área de estudio interesante en la patología del CRPC, ya que podría servir como biomarcador de la progresión de la patología (Y. Tian et al., 2014).

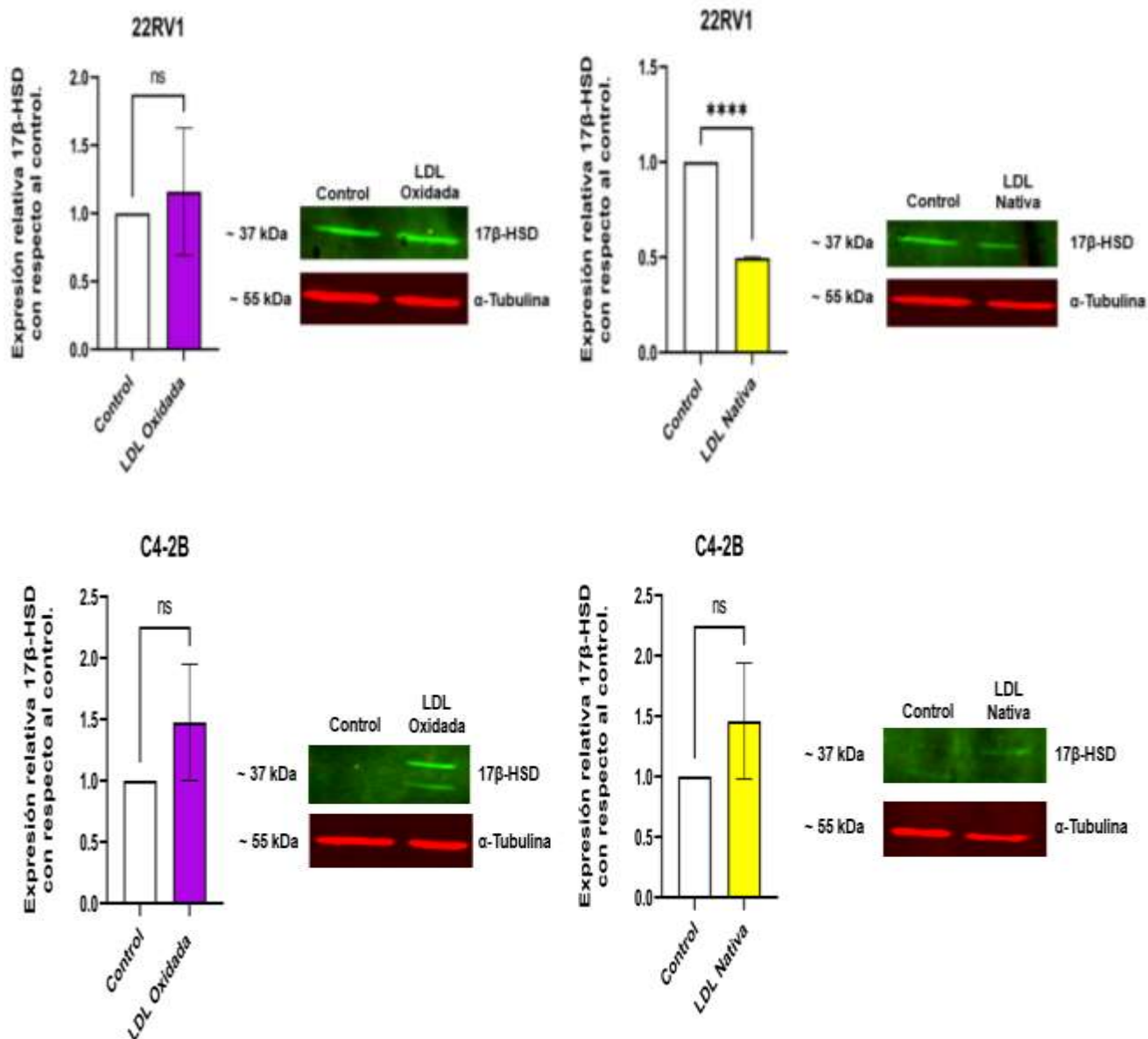


Figura 4. Expresión relativa de la enzima 17β-HSD respecto al control sin tratamiento. Las células de las líneas de CRPC 22RV1 y C4-2B fueron tratadas con 50 µg/mL de LDL nativa u oxidada y la expresión de 17β-HSD fue analizada a través de Western Blot. Las fluorescencias de cada banda fueron analizadas mediante el software Image Studio Lite y se evaluó la significacancia estadística mediante la prueba *t-Student* ($p \leq 0,05$), $n=2$. ($p \leq 0,05$), $n=3$ (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Por último, el tratamiento con 50 µg/mL de LDL oxidada resultó en una disminución de la expresión de la enzima 5α-reductasa en la línea celular 22RV1 y una sobreexpresión en la línea celular C4-2B (Figura 5). Sin embargo, estos hallazgos son preliminares y se necesita una mayor cantidad de réplicas para confirmar la tendencia y la significancia estadística.

La enzima 5α-reductasa desempeña un papel importante en la esteroidogénesis, especialmente en la vía de puerta frontal, convirtiendo la Testosterona en DHT. Aunque la esteroidogénesis intratumoral es un mecanismo conocido de resistencia a la privación de andrógenos, no está claro el papel que juega la enzima 5α-reductasa en este proceso. En este contexto, se ha demostrado que la producción de DHT ocurre principalmente a través de la vía de puerta trasera primaria, en lugar de la vía de puerta frontal donde actúa la enzima 5α-reductasa. Además, algunos estudios sugieren que la actividad de la enzima 5α-reductasa se encuentra reducida en modelos de CRPC isogénicos (LNCaP) a la línea celular C4-2B (Kosaka et al., 2013). Por otro lado, la DHT producida por la 5α-reductasa puede activar otras vías de señalización además de la mediada por el receptor de andrógenos. Por ejemplo, se ha demostrado que la DHT aumenta la resistencia a la terapia de privación de andrógenos mediante la activación de STAT5 vía receptor de glucocorticoides (Song, Kim, Min, & Ahn, 2014).

En conclusión, nuestros hallazgos contrastan con la evidencia disponible y se necesitan más estudios para comprender mejor la funcionalidad de la enzima 5 α -reductasa y su relación con el metabolismo de las lipoproteínas en el desarrollo de un fenotipo CRPC, mediado por la esteroidogénesis intratumoral.

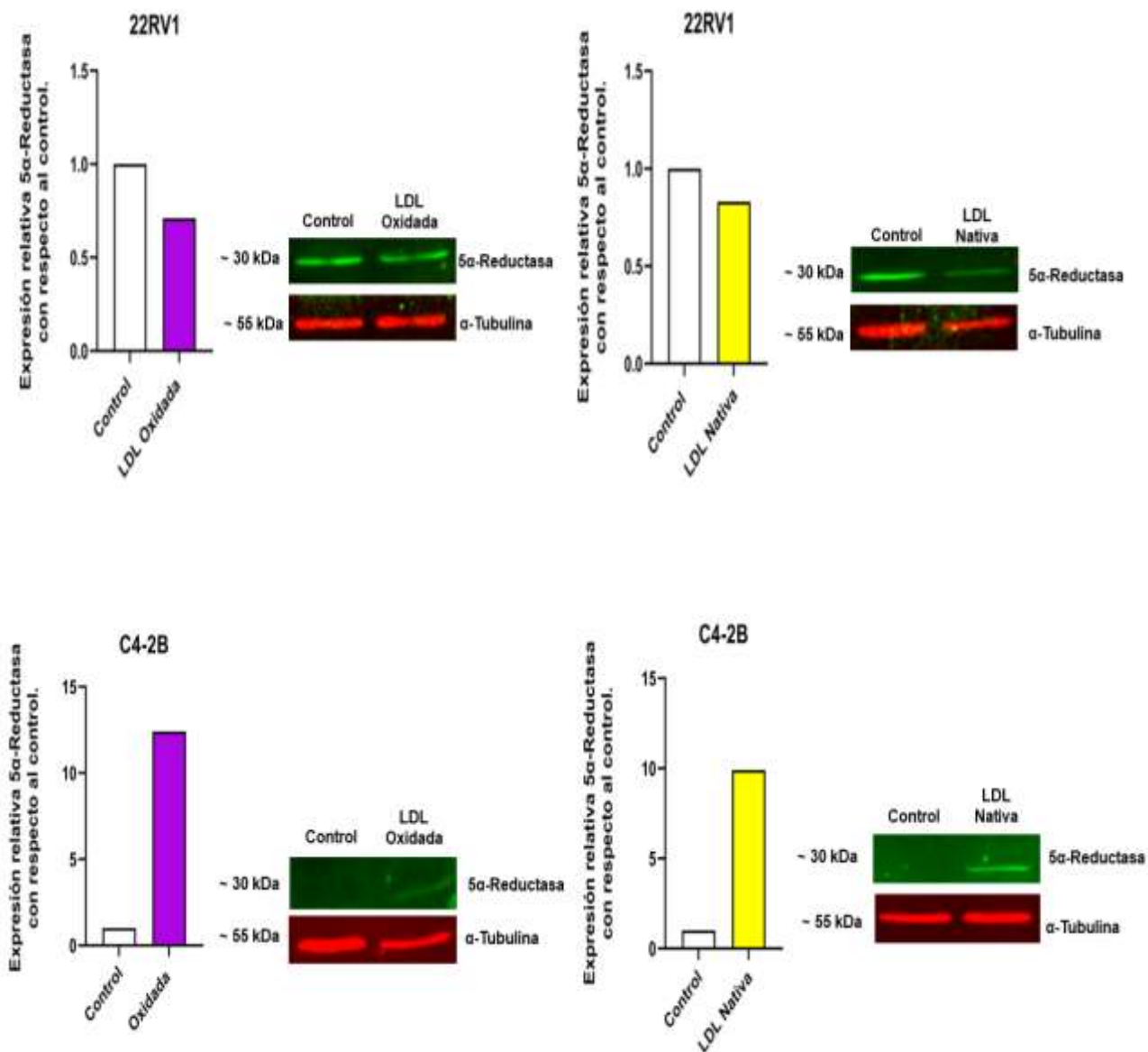


Figura 5. Expresión relativa de la enzima 5 α -reductasa respecto al control sin tratamiento. Las células de las líneas de CRPC 22RV1 y C4-2B fueron tratadas con 50 μ g/mL de LDL nativa u oxidada y la expresión de 5 α -reductasa fue analizada a través de Western Blot. Las fluorescencias de cada banda fueron analizadas mediante el software Image Studio Lite n=1.

8.2 Lipoproteínas de baja densidad oxidada genera aumento en la expresión de marcadores de progresión de CRPC y resistencia a ADT.

Se realizó un análisis con el propósito de verificar el papel de las lipoproteínas de baja densidad nativas y oxidadas en la progresión del fenotipo de cáncer de próstata resistente a la castración. Se evaluó la expresión de los marcadores de progresión de CRPC y resistencia a ADT, AR y AR-V7, en respuesta al tratamiento con LDL nativa u oxidada.

Los resultados muestran que la oxLDL aumenta la expresión del AR en un 1,8 y 1,7 veces en las líneas celulares 22RV1 y C4-2B, respectivamente, en comparación con el control sin tratamiento. En cambio, el tratamiento con LDL nativa no generó diferencias significativas en la expresión del AR para ninguna de las líneas celulares (Figura 6).

De igual manera, nuestros resultados muestran que el tratamiento de las células de CRPC con LDL oxidada genera un aumento en la expresión de la variante de empalme de AR, AR-V7 de 1,5 veces para la línea 22RV1 y 1,7 veces para la línea C4-2B. En contraste, el tratamiento con LDL nativa no genera diferencias significativas en la expresión de este marcador (Figura 7).

Como se ha mencionado anteriormente, la sobreexpresión de AR y AR-V7 ha sido ampliamente relacionada al desarrollo de CaP, la generación de

resistencia a ADT y el desarrollo de un fenotipo CRPC, además de la resistencia a la terapia antiesteroideogénica con abiraterona (Antonarakis et al., 2014). Particularmente, se ha demostrado que AR y sus variantes de empalme como AR-V7 se encuentran sobre expresados en la mayoría de los casos de CRPC y pueden actuar como mecanismo de resistencia a la terapia de privación de andrógenos (Banerjee et al., 2018; Sprenger & Plymate, 2014; Urbanucci et al., 2012). En conjunto, los datos obtenidos sugieren que la forma oxidada de la LDL y no su forma nativa es la que induce el aumento en la expresión de AR y AR-V7, lo que podría contribuir al desarrollo y progresión del fenotipo CRPC. De igual manera, nuestros resultados muestran que el tratamiento de las células de CRPC con LDL oxidada genera un aumento en la expresión de la variante de empalme de AR, AR-V7 de 1,5 veces para la línea 22RV1 y 1,7 veces para la línea C4-2B (Figura 7).

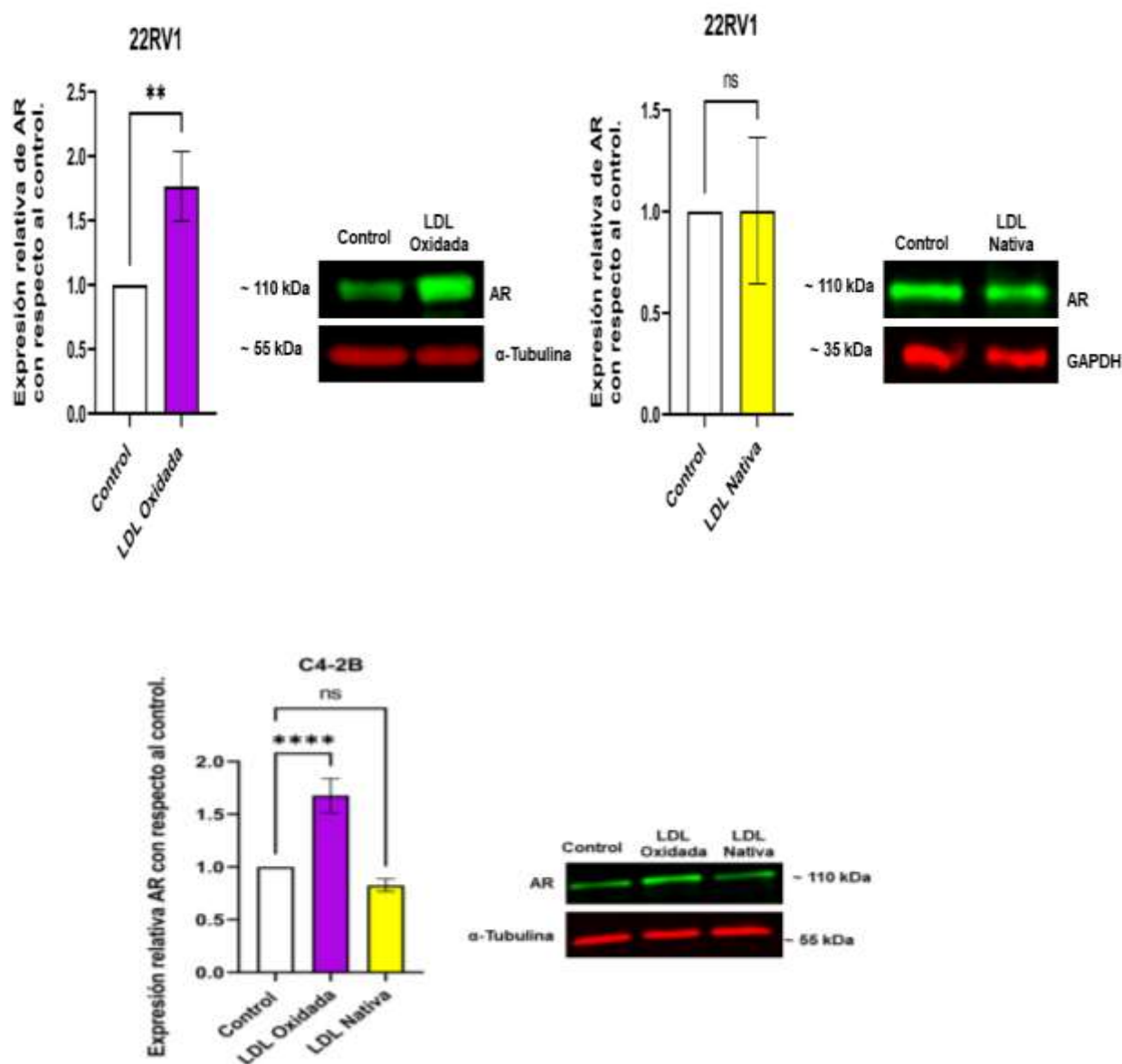


Figura 6: Expresión relativa de AR respecto al control sin tratamiento. Las células de las líneas de CRPC 22RV1 y C4-2B fueron tratadas con 50 μ g/mL de LDL nativa u oxidada y la expresión de AR fue analizada a través de Western Blot. Las fluorescencias de cada banda fueron analizadas mediante el software Image Studio Lite. Para la línea celular 22RV1 se evaluó la significancia estadística mediante la prueba t-Student ($p \leq 0,05$), $n=3$. Para la línea celular C4-2B se evaluó la significancia estadística mediante la prueba ANOVA ($p \leq 0,05$), $n=3$. ($p \leq 0,05$), $n=3$ (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

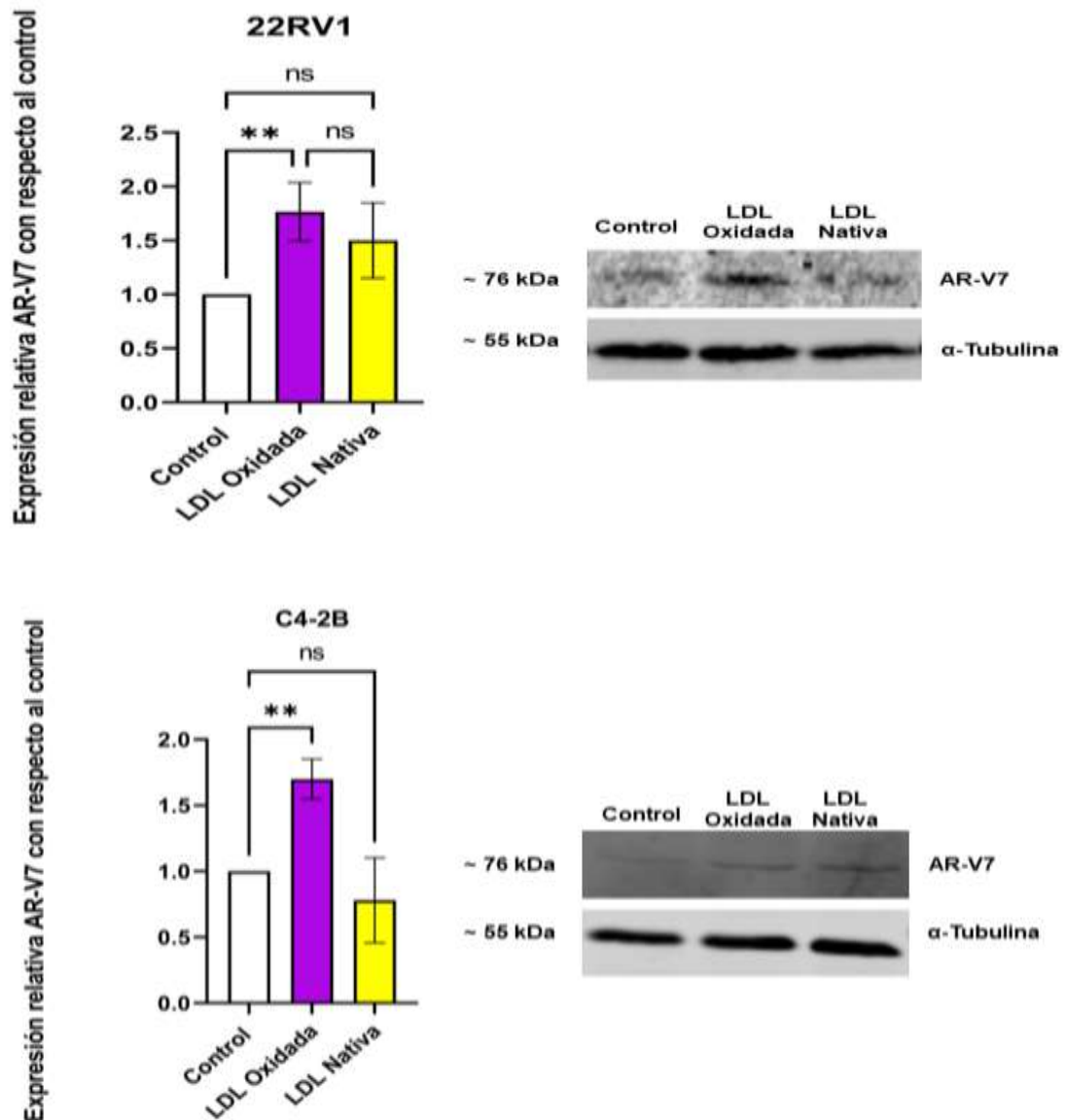


Figura 7: Expresión relativa de la variante de empalme de AR, AR-V7 respecto al control sin tratamiento. Las células de las líneas de CRPC 22RV1 y C4-2B fueron tratadas con 50 $\mu\text{g/mL}$ de LDL nativa u oxidada y la expresión de AR fue analizada a través de Western Blot. Las fluorescencias de cada banda fueron analizadas mediante el software Image Studio Lite. Se evaluó la significacancia estadística mediante la prueba ANOVA ($p \leq 0,05$), $n=3$. ($p \leq 0,05$), $n=3$ (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

8.3 Lipoproteína de baja densidad oxidada genera un aumento en la sobrevivencia de células de CaP dependiente de andrógenos, LNCaP, en respuesta a la privación de andrógenos.

Con los resultados anteriores, nos propusimos verificar la promoción de la esteroidogénesis por las lipoproteínas nativas y oxidadas en el desarrollo de un fenotipo CRPC en el cáncer de próstata.

Nuestros resultados muestran que las células sensibles a ADT, LNCaP disminuyen su viabilidad celular en respuesta a la privación de andrógenos. Sin embargo, el tratamiento con LDL oxidada genera un rescate de las células, aumentando la viabilidad celular en comparación a las células privadas de andrógenos. Por otro lado, el tratamiento con LDL nativa no genera diferencias significativas respecto a las células sin tratamiento (Figura 8).

Así, nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que la forma oxidada de la LDL contribuye significativamente al desarrollo de un fenotipo CRPC mediante la esteroidogénesis intracrina de células de CRPC. Sin embargo, no se puede descartar que oxLDL genere la activación de vías aberrantes que activan a AR independiente de ligando.

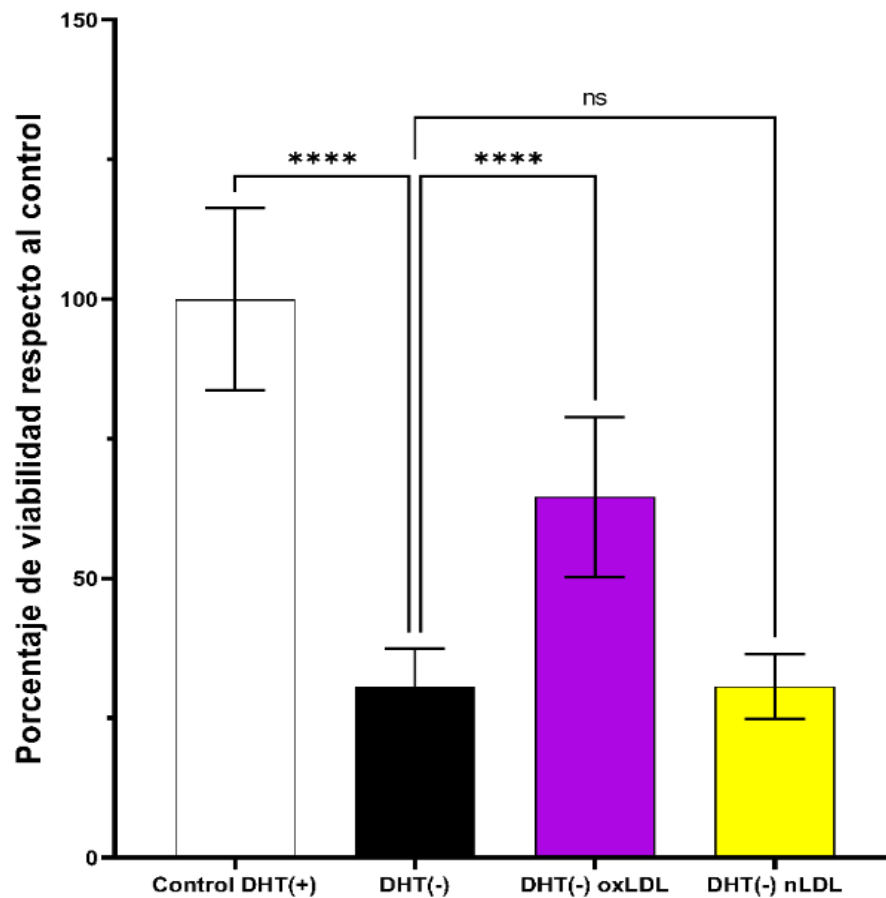


Figura 8. Porcentajes de viabilidad de células LNCaP frente a la privación de andrógenos, en distintas condiciones. Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero libre de Hormonas y luego fueron tratadas con 10nM DHT, y 50 μ g/mL de LDL oxidada (oxLDL) o LDL nativa (nLDL). Las células fueron teñidas mediante cristal violeta al 1% y la fluorescencia infrarroja fue medida con el fotodocumentador infrarrojo ODISSEY CLX, LI-COR (Texas, EEUU) y la intensidad de fluorescencia fue analizada usando el software Image Studio Lite. La significancia estadística se evaluó mediante una prueba ANOVA ($p \leq 0,05$), $n=3$.

8.4 Lipoproteína de baja densidad oxidada promueve la traslocación nuclear de AR y la expresión de ARNm de PSA en células de CRPC 22RV1 y C4-2B.

Previamente, hemos demostrado que solo la lipoproteína de baja densidad oxidada genera la sobreexpresión de la enzima clave en la esteroidogénesis, CYP17A1, la sobreexpresión de AR y el aumento de la supervivencia de células de CaP en condiciones de ADT (lo que indica un desarrollo de CRPC). En esta línea, nos propusimos analizar la activación de AR inducida por la lipoproteína de baja densidad oxidada, mediante la evaluación de su traslocación nuclear. Esto último indicará si AR está presente en el núcleo y desempeñando su papel como factor de transcripción. En ese sentido, también se analizó indirectamente la actividad de AR, evaluando su capacidad transcripcional, a través de la cuantificación por PCR del marcador específico de progresión bioquímica, PSA. Esto, debido a que PSA es regulado transcripcionalmente por andrógenos por medio de su receptor (AR) (Montgomery et al., 1992).

Nuestros resultados muestran que existe co-localización nuclear del receptor de andrógenos (AR) con DAPI. Además, esta co-localización se condice con el aumento de PSA a nivel transcripcional. Esto sugiere que el tratamiento con oxLDL activa el receptor AR (Figura 9).

En resumen, los resultados apoyan la hipótesis de que la LDL oxidada promueve el desarrollo de un fenotipo CRPC a través de la esteroidogénesis intratumoral y la expresión de sus marcadores de resistencia a ADT.

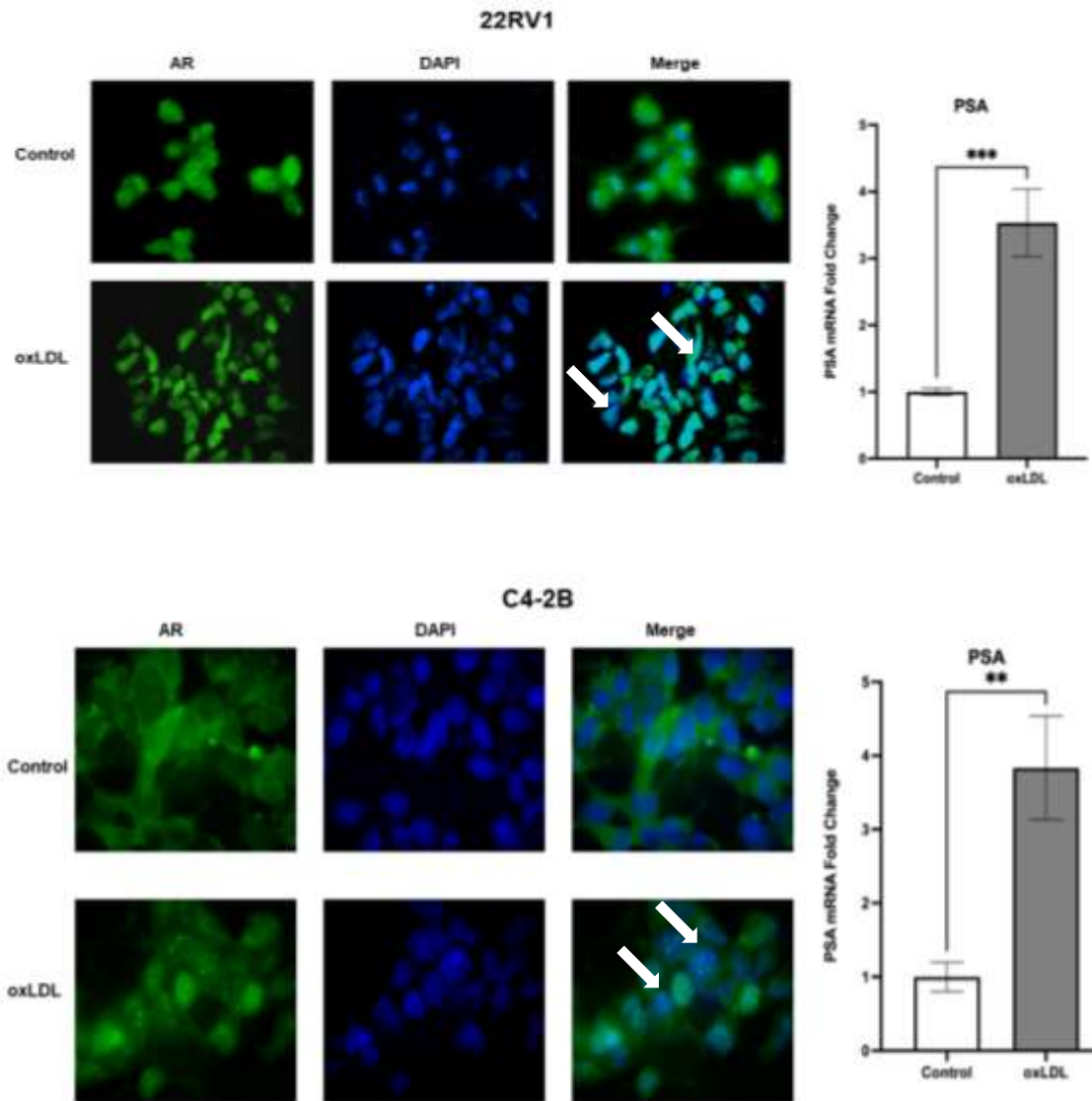


Figura 9: OxLDL promueve la translocación nuclear de AR y la expresión del ARNm del PSA en células C4-2B y 22RV1. Las flechas blancas indican la inmunodetección nuclear de AR en células C4-2B o 22RV1 tratadas con oxLDL. Para la cuantificación de PSA, la significancia estadística se evaluó mediante prueba *t-Student* para el análisis de la expresión de PSA (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

9. DISCUSIÓN

En la presente tesis postulamos que las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL, una forma modificada LDL) y no LDL contribuyen significativamente al desarrollo del fenotipo CRPC mediante la promoción de la expresión de enzimas esteroidogénicas, y marcadores de progresión, en células de CRPC *in vitro*. Nuestros resultados muestran que la LDL oxidada (oxLDL) y no LDL contribuye significativamente a la esteroidogénesis intratumoral a través de la sobreexpresión de enzimas esteroidogénicas como CYP17A1, AKR1C1 y a la progresión bioquímica *in vitro* mediante la sobreexpresión de PSA, AR y AR-V7 en las líneas celulares de C4-2B y 22RV1 incrementado el fenotipo CRPC.

El CRPC era conocido como una progresión andrógeno-independiente, sin embargo, la evidencia muestra que la señalización mediada por los andrógenos y su receptor se mantienen aun en concentraciones de andrógenos en niveles de castración (Mohler et al., 2004). En la actualidad, las nuevas terapias contra CRPC se enfocan precisamente en el eje andrógeno/AR. Esto debido a que las células de CRPC pueden progresar en concentraciones de andrógenos en condiciones de castración, a través de la generación de andrógenos autocrina o también conocido como esteroidogénesis intratumoral (Mostaghel et al., 2011).

En este mecanismo, las fuentes de colesterol son fundamentales puesto que este es el sustrato inicial para su generación. Este colesterol se adquiere principalmente por vía exógena (Yang et al., 2020) ya que se ha demostrado que las células de CRPC disminuyen la síntesis de colesterol por vía del mevalonato (Traugher et al., 2020). En este sentido, la LDL o sus formas modificadas podrían estar involucradas en la esteroidogénesis intratumoral, ya sea como una fuente de colesterol o como promotoras de la expresión de enzimas claves en este proceso,

En particular, esta tesis se ha dirigido hacia la esteroidogénesis intratumoral como un mecanismo de resistencia de CRPC y muestra que existe una relación con las lipoproteínas de baja densidad oxidadas, la sobreexpresión de enzimas esteroidogénicas y la progresión bioquímica del CRPC.

Primeramente, hemos demostrado que existe un aumento en la enzima clave en la esteroidogénesis CYP17A1 en células de CRPC tratadas con LDL oxidada. CYP17A1 es una enzima que participa en las primeras etapas de las tres vías de la esteroidogénesis (Zhou et al., 2021) por lo que su sobreexpresión indica claramente una mayor actividad esteroidogénica, en este caso, promovida por la LDL oxidada.

El aumento de CYP17A1 es ampliamente conocido por ser un mecanismo de resistencia de CRPC (Knuuttila et al., 2014) y su sobreexpresión es consistente con lo que sea ha reportado en bibliografía al ser identificado como un marcador clave de la esteroidogénesis intratumoral que promueve la progresión de la patología en modelos de CRPC que expresan el receptor de andrógenos (Bremmer et al., 2014; Locke et al., 2009). En este contexto, nuestros hallazgos indican que la LDL oxidada tiene un efecto en la promoción de la esteroidogénesis. Esto podría ser explicado por un mecanismo de regulación positiva en la expresión de la enzima esteroidogénica CYP17A1. O bien por la disponibilidad del sustrato colesterol contenido dentro del núcleo lipofílico de la LDL oxidada. Así, el colesterol podría ser incorporado mediante la captación de la LDL oxidada por receptores *scavenger*, como SCARB1 y LOX-1, los que se encuentran sobreexpresados en CRPC.(Gonzalez-Chavarria et al., 2018; Gordon et al., 2019). Sin embargo, no es posible descartar otras alternativas para la sobreexpresión de CYP17A1 generada por la LDL oxidada, tales como la activación de vías como STAT 3 y NF-κB. Con respecto a esto, nuestro grupo recientemente ha demostrado que la interacción oxLDL con el receptor *scavenger* LOX-1 genera la activación de estas vías aberrantes o independientes de AR y promueven la expresión de marcadores de progresión de CRPC en los modelos celulares 22RV1 y C4-2B (Duprat et al., 2023). Por esto se requiere un análisis más exhaustivos respecto de la función de oxLDL en la sobreexpresión de CYP17A1 provocada por la LDL oxidada, mediante el análisis de la activación

de estas vías aberrantes y la inhibición de su señalización, ya sea por silenciamiento de genes clave, o bien, mediante el uso de inhibidores selectivos.

Para la enzima 3 β -HSD (*AKR1C1*) el tratamiento con LDL nativa u oxidada no generó cambios significativos en su expresión. Sin embargo, se requiere un mayor número de réplicas en ambos casos para confirmar la tendencia y la significancia estadística. En contraste, para la línea celular C4-2B el tratamiento con LDL nativa u oxidada aumentó la expresión de la enzima lo cual refuerza la hipótesis de que la LDL oxidada genera un aumento en la esteroidogénesis intratumoral y, por tanto el desarrollo de un fenotipo CRPC. La no variación vista en la expresión de esta enzima en la línea 22RV1 podría ser explicada debido a que esta última presenta una serie de variantes de AR inpedientes de ligando, por lo cual, la dependencia de la esteroidogénesis intratumoral para la promoción de CRPC en esta línea sería limitada (Chou et al., 2019)

El aumento en la expresión de la enzima *AKR1C1* generado por la LDL nativa podría ser explicado debido al microambiente pro-oxidativo que generan las células de cáncer de próstata (Kumar et al., 2008). Así, la lipoproteína nativa podría ser oxidada antes de ser captada por la célula tumoral. Interesantemente la sobreexpresión de *AKR1C1* está relacionada con la generación de metástasis por activación de STAT3 en cáncer de pulmón de células no pequeñas (H. Tian et al., 2016), por lo cual, aun sin existir un aumento de la proteína, la mera expresión podría generar la activación de STAT3 y la progresión del CRPC, lo

cual se condice con los resultados obtenidos por nuestro grupo donde la activación de LOX-1 por la LDL oxidada genera la activación de esta vía aberrante independiente de AR (Duprat et al., 2023).

Por otro lado, nuestros resultados no muestran diferencias significativas en la expresión de la enzima 17- β HSD para las líneas celulares CRPC 22RV1 y C4-2B, frente al tratamiento con LDL oxidada. Sin embargo, es importante destacar que la desviación estándar de la medición de esta última resulta alta con un $n=2$, por lo cual, se requiere un mayor número de réplicas para poder obtener una tendencia y significancia estadística. En contraste, el tratamiento con LDL nativa generó una disminución en la expresión de la enzima AKR1C3 para la línea celular 22RV1. Interesantemente, la literatura solo describe la disminución de esta enzima en tumores del sistema nervioso central con fenotipo embrionario (Park et al., 2010), mientras que, en general, la sobreexpresión de AKR1C3 se encuentra asociada al desarrollo y progresión de CRPC (Hamid et al., 2013; Sun et al., 2016) debido a que cataliza los pasos finales de la conversión de androstenediona en dihidrotestosterona en las rutas de androgénesis de puerta frontal y trasera y, por tanto, promueve la esteroidogénesis intratumoral.

La enzima 17- β -HSD es una enzima de 35 kDa codificada por el gen *AKR1C3*, y actúa como homodímero (Lin et al., 1992). Con respecto a esto, es importante mencionar que, si bien los resultados expuestos anteriormente no

muestran un aumento significativo de la enzima AKR1C3 frente al tratamiento con LDL oxidada en ninguna de las dos líneas celulares, en los experimentos se logró visualizar la presencia de una banda cercana a los 70 kDa, lo cual, hipotetizamos, podría corresponder a la forma dimérica de AKR1C3, para la línea C4-2B. Esta banda sí presenta un aumento en su expresión para ambas líneas celulares tratadas con LDL oxidada (Anexo, Figura 1), lo cual estaría en concordancia con la promoción de la esteroidogénesis mediada por la sobreexpresión de enzimas clave y la promoción del fenotipo CRPC, tal y como se logró visualizar con CYP17A1. Considerando esto, resultaría interesante analizar la expresión de esta enzima por otros medios, tales como Page nativo, qPCR a nivel transcripcional o inmunocitoquímica, frente al tratamiento con lipoproteínas nativas u oxidadas, o bien, realizar otro tipo de análisis como el silenciamiento del gen *AKR1C3* en las mismas condiciones experimentales y así verificar su importancia en la esteroidogénesis intratumoral frente a la acción de la LDL oxidada.

En cuanto a la enzima 5 α -reductasa, esta corresponde a la enzima clave en la esteroidogénesis de puerta frontal, permitiendo el paso de testosterona a dihidrotestosterona (Zhou et al., 2021). En este contexto, se ha identificado el alza en la generación de DHT como mecanismo de resistencia a CRPC por lo cual, una sobreexpresión en la enzima 5 α -reductasa puede tener un impacto positivo en este mecanismo. Si bien nuestros datos no permiten concluir que la

LDL en su forma oxidada genera una sobreexpresión de la enzima 5 α -reductasa en células de CRPC, sí permiten observar una tendencia en la línea celular C4-2B, lo cual sería coincidente con la literatura, puesto que la sobreexpresión de la enzima promueve la respuesta a bajas concentraciones del andrógeno testosterona. De esta manera, se explicaría cómo el CRPC es capaz de progresar en bajas concentraciones de andrógenos (Thomas, Douglas, Rittmaster, & Too, 2009), sin embargo, no puede obviarse el hecho de que la LDL oxidada generaría una disminución en la expresión de la enzima en la línea 22RV1, nuevamente, lo que podría deberse a la expresión de múltiples variantes de empalme de AR en esta línea celular (Anexo, Figura 2).

En cuanto a la progresión tumoral de CRPC nuestros resultados muestran un aumento de AR y AR-V7 cuando las células son tratadas con LDL oxidada. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de AR y AR-V7 es mediada por la interacción con LOX-1 y la activación de las vías NF- κ B y STAT3 disminuyendo los efectos citotóxicos de Enzalutamida, otro antiandrógeno de nueva generación (Duprat et al., 2023), lo cual resulta relevante en la clínica del CRPC al exponer un nuevo foco de estudio para futuros tratamientos antiandrogénicos.

La activación de AR promovida por oxLDL demostrada mediante traslocación nuclear y aumento de mRNA de PSA muestran indirectamente que la LDL oxidada promueve la esteroidogénesis intratumoral, puesto que AR

necesita de un ligando para su activación. Nuestros hallazgos son consistentes con la literatura en la promoción de la esteroidogénesis como un mecanismo de resistencia a ADT en un fenotipo CRPC. Esta idea se refuerza al observar los resultados del ensayo de viabilidad con LDL nativa y oxidada, puesto que solo el tratamiento con LDL oxidada favorece la supervivencia celular en condiciones de privación de andrógenos en una líneas sensible a hormonas (LnCaP).

Cabe destacar que se requieren estudios complementarios para esclarecer aún más la función de las lipoproteínas en la esteroidogénesis intratumoral, evaluando cuál de los dos requisitos necesarios para la esteroidogénesis se encuentra mayoritariamente favorecido. A saber, la entrega de colesterol que servirá como sustrato inicial, o bien la sobreexpresión de las enzimas esteroidogénicas. Para ello, es posible desarrollar metodologías basadas en la medición directa de andrógenos mediante ELISA; la medición de cada uno de los metabolitos intermediarios en la androgénesis mediante HPLC-MS o bien, mediante análisis más complejos basados en lipidómica o la evaluación de la expresión de todas las enzimas esteroidogénicas mediante proteómica. Por último, resultaría interesante evaluar la visualización de la incorporación de colesterol mediante el uso de lipoproteínas con trazadores fluorescentes y colesterol-radioactivo para el seguimiento de carbonos en los metabolitos intermediarios de la síntesis de andrógenos.

Finalmente, nuestros resultados resultan valiosos para la investigación clínica del CRPC, pues muestran una contribución de las lipoproteínas de baja densidad y el desarrollo del fenotipo CRPC del CaP. En esta línea los altos niveles de LDL y LDL oxidada, típicamente asociados a la obesidad (Holvoet, De Keyzer, & Jacobs, 2008; Klop, Elte, & Cabezas, 2013), ahora presentan una asociación con la esteroidogénesis intratumoral, un mecanismo de resistencia a ADT y el desarrollo de un fenotipo CRPC. Así, esta información puede ser utilizada como base de nuevas estrategias de prevención y tratamiento, o el tratamiento farmacológico complementario a las terapias del CRPC con estatinas, una de las drogas más utilizadas en el *clearance* de LDL.

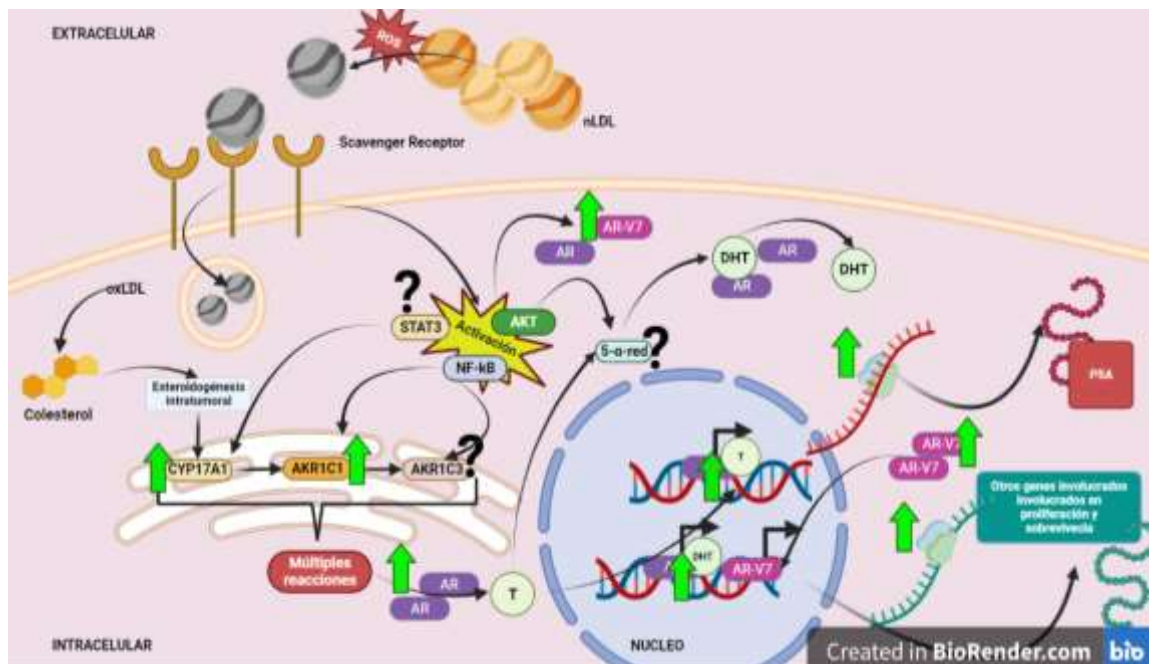


Figura 10: Modelo propuesto para la contribución de la lipoproteína de baja densidad oxidada a la esteroidogénesis intratumoral de células de CRPC. La LDL es oxidada por especies reactivas del oxígeno propias del microambiente tumoral. Luego, la LDL oxidada interactúa con receptores *scavenger* incorporando el colesterol contenido en la partícula, promoviendo la esteroidogénesis intratumoral de andrógenos por sobreexpresión de enzimas esteroidogénicas por disponibilidad del sustrato colesterol o posible activación de vías aberrantes STAT3, NF-κB y AKT que, a su vez, generan sobreexpresión de AR y su traslocación al núcleo. Paralelamente, AR-V7 se sobreexpresa por vías aberrantes y se trasloca al núcleo. En conjunto, estos hechos promueven la expresión de genes diana dependientes de AR, tales como PSA, generando el desarrollo del fenotipo CRPC.

10. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.

Este trabajo logró cumplir con el objetivo principal de analizar la contribución de las lipoproteínas nativas y oxidadas en la esteroidogénesis intratumoral y la progresión de células de CRPC, mostrando que las lipoproteínas de baja densidad oxidadas contribuyen significativamente al desarrollo del fenotipo CRPC mediante la expresión de enzimas esteroidogénicas y marcadores de progresión bioquímica y resistencia a ADT, en células de CRPC *in vitro*. Por lo cual, la hipótesis de trabajo es aceptada.

Nuestros resultados resultan interesantes desde el punto de vista de la contribución de las lipoproteínas a la esteroidogénesis intratumoral, demostrando que las lipoproteínas de baja densidad oxidadas favorecen la expresión de enzimas esteroidogénicas y la activación AR. Sin embargo, proyectamos la necesidad de realizar estudios complementarios para determinar si la promoción de la expresión de enzimas esteroidogénicas y marcadores de resistencia a ADT está dada por una mayor disponibilidad de sustrato colesterol, o bien, por la activación de vías aberrantes independientes de AR, tales como AKT, STAT3 y NF- κ B.

Ahora bien, tomando en cuenta el contexto de la fisiopatología del cáncer, donde el microambiente tumoral involucra interacciones y reacciones complejas, no solo entre las células cancerosas, sino también con células del estroma tumoral, surgen nuevas preguntas respecto de cuál sería el papel que juegan las lipoproteínas de baja densidad en este microambiente. El cáncer se caracteriza por una inflamación crónica y la abundante presencia de especies reactivas del oxígeno que podrían mediar la oxidación de partículas como la LDL, generando así su oxidación en el mismo microambiente tumoral, previo al ingreso a la célula de CRPC. De esta manera, podrían generarse nuevos focos de estudio que den cuenta de la importancia del proceso de oxidación de la LDL en el microambiente tumoral y su relación con la esteroidogénesis intratumoral, la cual hemos demostrado *in vitro*, se encuentra aumentada frente a la exposición a estas lipoproteínas oxidadas.

11. REFERENCIAS.

- Abdulghani, J., Gu, L., Dagvadorj, A., Lutz, J., Leiby, B., Bonuccelli, G., . . . Nevalainen, M. T. (2008). Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer. *Am J Pathol*, 172(6), 1717-1728. doi:10.2353/ajpath.2008.071054
- Allott, E. H., Masko, E. M., & Freedland, S. J. (2013). Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. *Eur Urol*, 63(5), 800-809. doi:10.1016/j.eururo.2012.11.013
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Lubber, B., Nakazawa, M., Roeser, J. C., . . . Luo, J. (2014). AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, 371(11), 1028-1038. doi:10.1056/NEJMoa1315815
- Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., & Zirkin, B. R. (2018). Androgen action in prostate function and disease. *Am J Clin Exp Urol*, 6(2), 62-77. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29666834>
- Bechis, S. K., Carroll, P. R., & Cooperberg, M. R. (2011). Impact of age at diagnosis on prostate cancer treatment and survival. *J Clin Oncol*, 29(2), 235-241. doi:10.1200/JCO.2010.30.2075
- Bremmer, F., Jarry, H., Strauss, A., Behnes, C. L., Trojan, L., & Thelen, P. (2014). Increased expression of CYP17A1 indicates an effective targeting of the androgen receptor axis in castration resistant prostate cancer (CRPC). *Springerplus*, 3, 574. doi:10.1186/2193-1801-3-574
- Cáceres, M. P. C. (2022). *FUNCIÓN DEL RECEPTOR LOX-1 EN LA RESISTENCIA A CABAZITAXEL INDUCIDA POR ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NF- κ B EN MODELOS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A CASTRACIÓN.*
- Cai, C., Chen, S., Ng, P., Bubley, G. J., Nelson, P. S., Mostaghel, E. A., . . . Balk, S. P. (2011). Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors. *Cancer Res*, 71(20), 6503-6513. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0532

- Cao, B., Qi, Y., Zhang, G., Xu, D., Zhan, Y., Alvarez, X., . . . Dong, Y. (2014). Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget*, 5(6), 1646-1656. doi:10.18632/oncotarget.1802
- Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*, 4(3), 365-380. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02
- Chang, K. H., Li, R., Kuri, B., Lotan, Y., Roehrborn, C. G., Liu, J., . . . Sharifi, N. (2013). A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cell*, 154(5), 1074-1084. doi:10.1016/j.cell.2013.07.029
- Chou, F. J., Chen, Y., Chen, D., Niu, Y., Li, G., Keng, P., . . . Chang, C. (2019). Preclinical study using androgen receptor (AR) degradation enhancer to increase radiotherapy efficacy via targeting radiation-increased AR to better suppress prostate cancer progression. *EBioMedicine*, 40, 504-516. doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.050
- Crona, D. J., & Whang, Y. E. (2017). Androgen Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms Involved in Prostate Cancer Therapy Resistance. *Cancers (Basel)*, 9(6). doi:10.3390/cancers9060067
- Dillard, P. R., Lin, M. F., & Khan, S. A. (2008). Androgen-independent prostate cancer cells acquire the complete steroidogenic potential of synthesizing testosterone from cholesterol. *Mol Cell Endocrinol*, 295(1-2), 115-120. doi:10.1016/j.mce.2008.08.013
- Duprat, F., Robles, C., Castillo, M. P., Rivas, Y., Mondaca, M., Jara, N., . . . González-Chavarría, I. (2023). LOX-1 Activation by oxLDL Induces AR and AR-V7 Expression via NF- κ B and STAT3 Signaling Pathways Reducing Enzalutamide Cytotoxic Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5082. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/6/5082>
- Estadísticas, I. N. d. (2019). *ANUARIO DE ESTADÍSTICAS VITALES, 2019 Período de información: 2019*. Retrieved from
- Evaul, K., Li, R., Papari-Zareei, M., Auchus, R. J., & Sharifi, N. (2010). 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase is a possible pharmacological target in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Endocrinology*, 151(8), 3514-3520. doi:10.1210/en.2010-0138

- Gandaglia, G., Leni, R., Bray, F., Fleshner, N., Freedland, S. J., Kibel, A., . . . La Vecchia, C. (2021). Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol*, 4(6), 877-892. doi:10.1016/j.euo.2021.09.006
- Ghosh, P. M., Malik, S., Bedolla, R., & Kreisberg, J. I. (2003). Akt in prostate cancer: possible role in androgen-independence. *Curr Drug Metab*, 4(6), 487-496. doi:10.2174/1389200033489226
- Gioeli, D., Mandell, J. W., Petroni, G. R., Frierson, H. F., Jr., & Weber, M. J. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res*, 59(2), 279-284. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927031>
- Giona, S. (2021). The Epidemiology of Prostate Cancer. In S. R. J. Bott & K. L. Ng (Eds.), *Prostate Cancer*. Brisbane (AU).
- GLOBOCAN. (2022a). *Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, all cancers, both sexes, all ages*. Retrieved from
- GLOBOCAN. (2022b). *Estimated number of incident cases and deaths World, Chile, both sexes, all ages (excl. NMSC)*. Retrieved from
- GLOBOCAN. (2022c). *Estimated number of new cases from 2020 to 2040, Both sexes, age [0-85+]*. Retrieved from
- Gonzalez-Chavarria, I., Fernandez, E., Gutierrez, N., Gonzalez-Horta, E. E., Sandoval, F., Cifuentes, P., . . . Toledo, J. R. (2018). LOX-1 activation by oxLDL triggers an epithelial mesenchymal transition and promotes tumorigenic potential in prostate cancer cells. *Cancer Lett*, 414, 34-43. doi:10.1016/j.canlet.2017.10.035
- Gordon, J. A., Noble, J. W., Midha, A., Derakhshan, F., Wang, G., Adomat, H. H., . . . Cox, M. E. (2019). Upregulation of Scavenger Receptor B1 Is Required for Steroidogenic and Nonsteroidogenic Cholesterol Metabolism in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 79(13), 3320-3331. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2529
- Gregory, C. W., Johnson, R. T., Jr., Mohler, J. L., French, F. S., & Wilson, E. M. (2001). Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res*, 61(7), 2892-2898. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306464>
- Grino, P. B., Griffin, J. E., & Wilson, J. D. (1990). Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to

- dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 126(2), 1165-1172. doi:10.1210/endo-126-2-1165
- Grivennikov, S. I., & Karin, M. (2010). Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev*, 20(1), 65-71. doi:10.1016/j.gde.2009.11.004
- Hamid, A. R., Pfeiffer, M. J., Verhaegh, G. W., Schaafsma, E., Brandt, A., Sweep, F. C., . . . Schalken, J. A. (2013). Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is a biomarker and therapeutic target for castration-resistant prostate cancer. *Mol Med*, 18(1), 1449-1455. doi:10.2119/molmed.2012.00296
- Holvoet, P., De Keyzer, D., & Jacobs, D. R., Jr. (2008). Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol*, 3(6), 637-649. doi:10.2217/17460875.3.6.637
- Isaacs, J. T., & Coffey, D. S. (1981). Changes in dihydrotestosterone metabolism associated with the development of canine benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology*, 108(2), 445-453. doi:10.1210/endo-108-2-445
- Ismail, H. A., Lessard, L., Mes-Masson, A. M., & Saad, F. (2004). Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate*, 58(3), 308-313. doi:10.1002/pros.10335
- Janne, O. A., & Shan, L. X. (1991). Structure and function of the androgen receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 626, 81-91. doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb37902.x
- Kim, J., & Coetzee, G. A. (2004). Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *J Cell Biochem*, 93(2), 233-241. doi:10.1002/jcb.20228
- Klop, B., Elte, J. W., & Cabezas, M. C. (2013). Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 5(4), 1218-1240. doi:10.3390/nu5041218
- Knuuttila, M., Yarkin, E., Kallio, J., Savolainen, S., Laajala, T. D., Aittokallio, T., . . . Makela, S. (2014). Castration induces up-regulation of intratumoral androgen biosynthesis and androgen receptor expression in an orthotopic VCaP human prostate cancer xenograft model. *Am J Pathol*, 184(8), 2163-2173. doi:10.1016/j.ajpath.2014.04.010
- Kok, D. E., van Roermund, J. G., Aben, K. K., den Heijer, M., Swinkels, D. W., Kampman, E., & Kiemeny, L. A. (2011). Blood lipid levels and prostate

- cancer risk; a cohort study. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 14(4), 340-345. doi:10.1038/pcan.2011.30
- Kosaka, T., Miyajima, A., Nagata, H., Maeda, T., Kikuchi, E., & Oya, M. (2013). Human castration resistant prostate cancer rather prefer to decreased 5alpha-reductase activity. *Sci Rep*, 3, 1268. doi:10.1038/srep01268
- Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B., & Koul, H. K. (2008). Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res*, 68(6), 1777-1785. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5259
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S. X., Labrie, C., Simard, J., Breton, R., & Belanger, A. (1997). The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*, 62(1), 148-158. doi:10.1016/s0039-128x(96)00174-2
- Lacouture, A., Lafront, C., Peillex, C., Pelletier, M., & Audet-Walsh, E. (2022). Impacts of endocrine-disrupting chemicals on prostate function and cancer. *Environ Res*, 204(Pt B), 112085. doi:10.1016/j.envres.2021.112085
- Li, R., Evaul, K., Sharma, K. K., Chang, K. H., Yoshimoto, J., Liu, J., . . . Sharifi, N. (2012). Abiraterone inhibits 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a rationale for increasing drug exposure in castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 18(13), 3571-3579. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0908
- Lin, S. X., Yang, F., Jin, J. Z., Breton, R., Zhu, D. W., Luu-The, V., & Labrie, F. (1992). Subunit identity of the dimeric 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human placenta. *J Biol Chem*, 267(23), 16182-16187. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1322895>
- Liu, C., Yang, J. C., Armstrong, C. M., Lou, W., Liu, L., Qiu, X., . . . Gao, A. C. (2019). AKR1C3 Promotes AR-V7 Protein Stabilization and Confers Resistance to AR-Targeted Therapies in Advanced Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther*, 18(10), 1875-1886. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1322
- Locke, J. A., Fazli, L., Adomat, H., Smyl, J., Weins, K., Lubik, A. A., . . . Tomlinson Guns, E. S. (2009). A novel communication role for CYP17A1 in the progression of castration-resistant prostate cancer. *Prostate*, 69(9), 928-937. doi:10.1002/pros.20940

- Lonergan, P. E., & Tindall, D. J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog*, 10, 20. doi:10.4103/1477-3163.83937
- Mansinho, A., Macedo, D., Fernandes, I., & Costa, L. (2018). Castration-Resistant Prostate Cancer: Mechanisms, Targets and Treatment. *Adv Exp Med Biol*, 1096, 117-133. doi:10.1007/978-3-319-99286-0_7
- Miller, D. R., Ingersoll, M. A., Chou, Y. W., Wakefield, C. B., Tu, Y., Lin, F. F., . . . Lin, M. F. (2017). Anti-Androgen Abiraterone Acetate Improves the Therapeutic Efficacy of Statins on Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. *J Oncol Res Ther*, 3(5). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31328181>
- MINSAL, M. d. S. d. C. (2015). Cáncer de próstata en personas de 15 años y más. In.
- Mohler, J. L., Gregory, C. W., Ford, O. H., 3rd, Kim, D., Weaver, C. M., Petrusz, P., . . . French, F. S. (2004). The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 10(2), 440-448. doi:10.1158/1078-0432.ccr-1146-03
- Montgomery, B. T., Young, C. Y., Bilhartz, D. L., Andrews, P. E., Prescott, J. L., Thompson, N. F., & Tindall, D. J. (1992). Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate*, 21(1), 63-73. doi:10.1002/pros.2990210107
- Mostaghel, E. A., Marck, B. T., Plymate, S. R., Vessella, R. L., Balk, S., Matsumoto, A. M., . . . Montgomery, R. B. (2011). Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clin Cancer Res*, 17(18), 5913-5925. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0728
- Mullen, P. J., Yu, R., Longo, J., Archer, M. C., & Penn, L. Z. (2016). The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nat Rev Cancer*, 16(11), 718-731. doi:10.1038/nrc.2016.76
- Nakayama, H., Sekine, Y., Oka, D., Miyazawa, Y., Arai, S., Koike, H., . . . Suzuki, K. (2022). Combination therapy with novel androgen receptor antagonists and statin for castration-resistant prostate cancer. *Prostate*, 82(3), 314-322. doi:10.1002/pros.24274
- Nantermet, P. V., Xu, J., Yu, Y., Hodor, P., Holder, D., Adamski, S., . . . Ray, W. J. (2004). Identification of genetic pathways activated by the androgen

receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. *J Biol Chem*, 279(2), 1310-1322. doi:10.1074/jbc.M310206200

National Cancer Institute, N. (2010

). US Census NODB-IMPAC. In.

Park, A. L., Lin, H. K., Yang, Q., Sing, C. W., Fan, M., Mapstone, T. B., . . . Fung, K. M. (2010). Differential expression of type 2 3alpha/type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) in tumors of the central nervous system. *Int J Clin Exp Pathol*, 3(8), 743-754. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21151387>

Pelton, K., Freeman, M. R., & Solomon, K. R. (2012). Cholesterol and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 12(6), 751-759. doi:10.1016/j.coph.2012.07.006

Shorning, B. Y., Dass, M. S., Smalley, M. J., & Pearson, H. B. (2020). The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *Int J Mol Sci*, 21(12). doi:10.3390/ijms21124507

Song, C., Kim, Y., Min, G. E., & Ahn, H. (2014). Dihydrotestosterone enhances castration-resistant prostate cancer cell proliferation through STAT5 activation via glucocorticoid receptor pathway. *Prostate*, 74(12), 1240-1248. doi:10.1002/pros.22841

Sprenger, C. C., & Plymate, S. R. (2014). The link between androgen receptor splice variants and castration-resistant prostate cancer. *Horm Cancer*, 5(4), 207-217. doi:10.1007/s12672-014-0177-y

Stoykova, G. E., & Schlaepfer, I. R. (2019). Lipid Metabolism and Endocrine Resistance in Prostate Cancer, and New Opportunities for Therapy. *Int J Mol Sci*, 20(11). doi:10.3390/ijms20112626

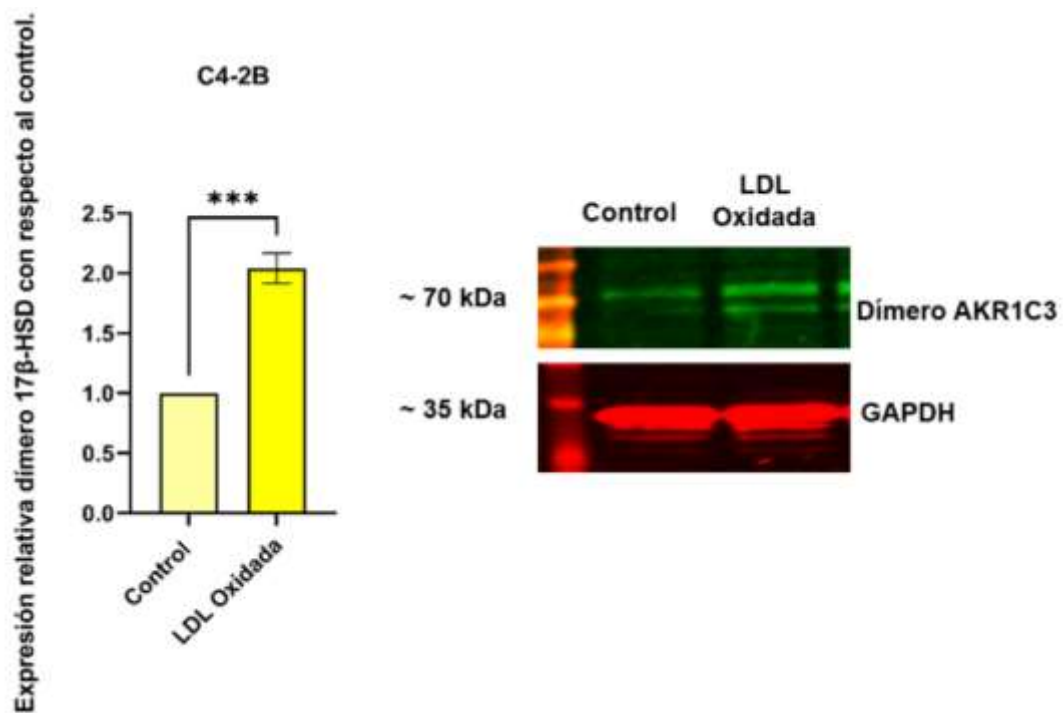
Suh, J., & Rabson, A. B. (2004). NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem*, 91(1), 100-117. doi:10.1002/jcb.10729

Sun, S. Q., Gu, X., Gao, X. S., Li, Y., Yu, H., Xiong, W., . . . Zhou, D. (2016). Overexpression of AKR1C3 significantly enhances human prostate cancer cells resistance to radiation. *Oncotarget*, 7(30), 48050-48058. doi:10.18632/oncotarget.10347

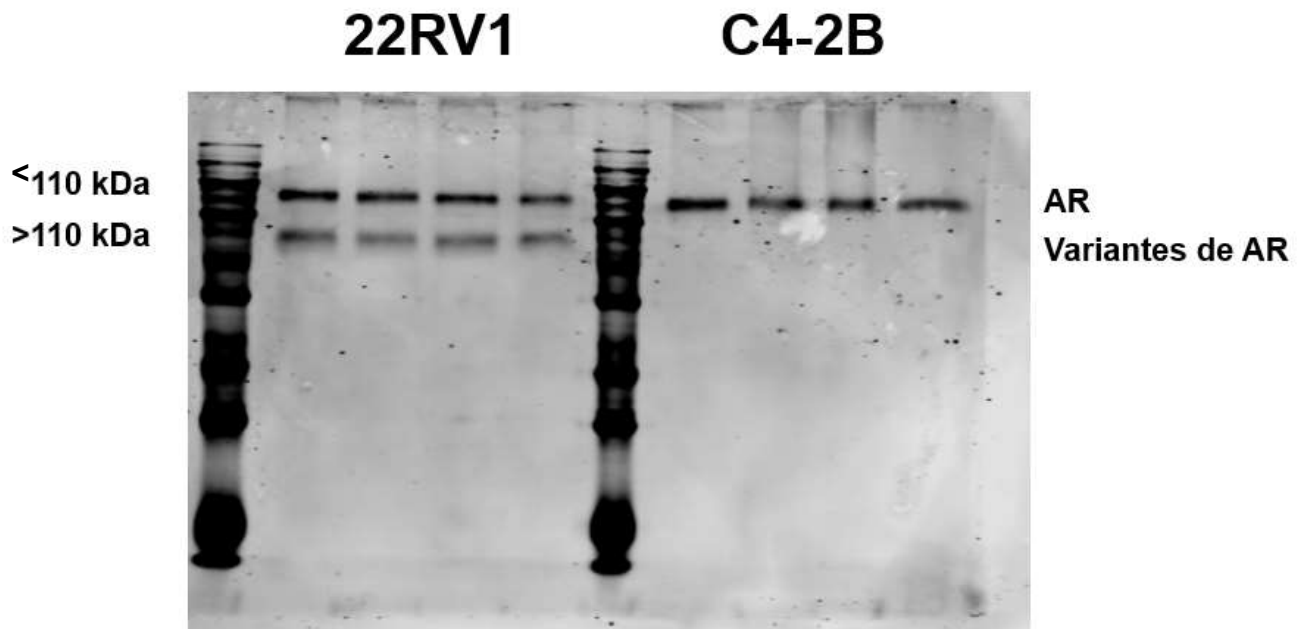
- Thomas, L. N., Douglas, R. C., Rittmaster, R. S., & Too, C. K. (2009). Overexpression of 5 alpha-reductase type 1 increases sensitivity of prostate cancer cells to low concentrations of testosterone. *Prostate*, 69(6), 595-602. doi:10.1002/pros.20911
- Tian, H., Li, X., Jiang, W., Lv, C., Sun, W., Huang, C., & Chen, R. (2016). High expression of AKR1C1 is associated with proliferation and migration of small-cell lung cancer cells. *Lung Cancer (Auckl)*, 7, 53-61. doi:10.2147/LCTT.S90694
- Tian, Y., Zhao, L., Zhang, H., Liu, X., Zhao, L., Zhao, X., . . . Li, J. (2014). AKR1C3 overexpression may serve as a promising biomarker for prostate cancer progression. *Diagn Pathol*, 9, 42. doi:10.1186/1746-1596-9-42
- Tousignant, K. D., Rockstroh, A., Poad, B. L. J., Talebi, A., Young, R. S. E., Taherian Fard, A., . . . Sadowski, M. C. (2020). Therapy-induced lipid uptake and remodeling underpin ferroptosis hypersensitivity in prostate cancer. *Cancer Metab*, 8, 11. doi:10.1186/s40170-020-00217-6
- Traugher, C. A., Opoku, E., Brubaker, G., Major, J., Lu, H., Lorkowski, S. W., . . . Smith, J. D. (2020). Uptake of high-density lipoprotein by scavenger receptor class B type 1 is associated with prostate cancer proliferation and tumor progression in mice. *J Biol Chem*, 295(24), 8252-8261. doi:10.1074/jbc.RA120.013694
- Urbanucci, A., Sahu, B., Seppala, J., Larjo, A., Latonen, L. M., Waltering, K. K., . . . Visakorpi, T. (2012). Overexpression of androgen receptor enhances the binding of the receptor to the chromatin in prostate cancer. *Oncogene*, 31(17), 2153-2163. doi:10.1038/onc.2011.401
- Vickman, R. E., Franco, O. E., Moline, D. C., Vander Griend, D. J., Thumbikat, P., & Hayward, S. W. (2020). The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian J Urol*, 7(3), 191-202. doi:10.1016/j.ajur.2019.10.003
- Wang, Q., Li, W., Zhang, Y., Yuan, X., Xu, K., Yu, J., . . . Brown, M. (2009). Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell*, 138(2), 245-256. doi:10.1016/j.cell.2009.04.056
- Weinberg, F., Ramnath, N., & Nagrath, D. (2019). Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers (Basel)*, 11(8). doi:10.3390/cancers11081191
- Whitehead, S. N. y. S. (2001). *Endocrinology: An Integrated Approach*.

- Xiao, L., Wang, Y., Xu, K., Hu, H., Xu, Z., Wu, D., . . . Chan, F. L. (2018). Nuclear Receptor LRH-1 Functions to Promote Castration-Resistant Growth of Prostate Cancer via Its Promotion of Intratumoral Androgen Biosynthesis. *Cancer Res*, 78(9), 2205-2218. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2341
- Yang, H. X., Zhang, M., Long, S. Y., Tuo, Q. H., Tian, Y., Chen, J. X., . . . Liao, D. F. (2020). Cholesterol in LDL receptor recycling and degradation. *Clin Chim Acta*, 500, 81-86. doi:10.1016/j.cca.2019.09.022
- Zhang, L., Altuwaijri, S., Deng, F., Chen, L., Lal, P., Bhanot, U. K., . . . Gerald, W. L. (2009). NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *Am J Pathol*, 175(2), 489-499. doi:10.2353/ajpath.2009.080727
- Zhao, J., Zhang, M., Liu, J., Liu, Z., Shen, P., Nie, L., . . . Zeng, H. (2019). AKR1C3 expression in primary lesion rebiopsy at the time of metastatic castration-resistant prostate cancer is strongly associated with poor efficacy of abiraterone as a first-line therapy. *Prostate*, 79(13), 1553-1562. doi:10.1002/pros.23875
- Zhou, J., Wang, Y., Wu, D., Wang, S., Chen, Z., Xiang, S., & Chan, F. L. (2021). Orphan nuclear receptors as regulators of intratumoral androgen biosynthesis in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*, 40(15), 2625-2634. doi:10.1038/s41388-021-01737-1

12. ANEXO



Anexo Figura 1: Expresión del dímero de la enzima AKR1C3 en línea celular C4-2B.



Anexo Figura 2: Expresión de variantes del receptor de andrógenos. Se observa que la línea celular 22RV1 posee mayor expresión de variantes que la línea C4-2B. 30µg de proteínas totales fueron cargados por cada carril.