



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Biotecnología Molecular

**Acción sinérgica entre ox-LDL y TNF- α en la
activación de las vías de señalización intracelular
sensibles a especies redox y su relación con la
proliferación celular en cáncer colorrectal.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Biotecnología Molecular

Por: María Esther Palma Vejares
Profesor Guía: Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso
Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos
Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Concepción, 27 de junio de 2025

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

“A quienes vivieron con miedo, con dudas y con heridas, pero igual
siguieron adelante. Porque ser valiente no es no temer, sino avanzar a pesar
del miedo”

Taylor Swift

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a cada persona que me pudo acompañar en este arduo camino llamo tesis de Magíster, ya sea con una palabra de aliento, un abrazo o solo su presencia en silencio. Agradezco en el alma que los caminos de la vida me hayan llevado a la amistad tan hermosa con Paula, gracias por creer en mí, por el amor y cuidado constante, por ser de esas amistades que pocas veces encuentras en la vida y que valen cada segundo de compañía. Gracias por acompañarme en este largo camino incluso en la distancia, incluso con 14 horas de diferencia siempre me sentí acompañada con tu amistad, te adoro y estoy completamente orgullosa de quién eres.

Gracias a mi familia, a mi madre por el apoyo constante, por las comidas para no enfermar, por cuidar a Ikky mientras yo terminaba mi posgrado y en especial por amarme incondicionalmente. A mi padre por todo el apoyo recibido, las llamadas constantes y la preocupación. A mi hermano por su forma particular de quererme y cuidarme. A mi tía Teresa y abuela Teresa por amarme y cuidarme incluso en la distancia. A mis primas Ale y Ange, a mis sobrinos Byron y Belén por llenarme de amor y felicidad con sus visitas o incluso a la distancia. Su presencia me llena el corazoncito de amor y energía. Familia, nada de esto hubiese sido posible sin el apoyo y amor incondicional de todos ustedes. Los Amo.

Gracias a Joao por haber sido mi luz en la oscuridad cuando más lo necesite. Estaré eternamente agradecida por su cariño, cuidado y apoyo constante, Las palabras no alcanzan para expresar mi gratitud. Te quiero.

Gracias a Eddy por enseñarme y ayudarme desde el primer día que llegue al laboratorio, incluso cuando ya estaba a miles de kilómetros de acá.

Gracias a mis compañeros y amigos que pude hacer en el lab. Quiero agradecer en especial a Félix por su constante amor, ayuda y preocupación. A María Paz, Javi, Estefi, Yerko, Seba, Brian, Marce, Matheus, Leo por sus risas, cariño y compañía en los días que eran más difíciles en el lab. A Carlita,

que su energía lograba que hasta el peor de los días o tormentas se transformaran en días de sol y arcoíris. Gracias por tu amor y compañía.

Gracias a Eli por ser mi compañera y amiga de experimentos, partner de protocolos y de la vendita ox-LDL. Gracias por su constante guía y apoyo.

Gracias a Santi por su paciencia, su ayuda, los almuerzo y oncesitas, las películas y los días de ver los Simpson.

Gracias a Nicolas, Felipe y Ange por siempre haber estado cuando necesitaba resolver dudas o planificar de mejor forma algún experimento.

Gracias a Coté por las largas conversaciones de pasillo en donde intentábamos resolver nuestro mundo, no lo lográbamos, pero nos reíamos de nuestras desgracias.

A mi tutor, el profesor Jorge Toledo por su guía, comprensión y por darme un espacio en su laboratorio para hacer mi tesis de pregrado y posgrado.

A mi grupo de amigos de Valorant y de primordiales, gracias por las risas después de llegar cansada del lab.

Agradezco al programa de Magíster en Biotecnología Molecular por todo el aprendizaje y el crecimiento como personal. A la asociación de mujeres universitarias (AMUC) por otorgarme la beca que permitió continuar con mis estudios de posgrado.

A Ikky, mi compañero fiel, en que en los tiempos de pandemia dormía en mis brazos mientras estaba en clases o estudiaba. Su compañía permitía que todo fuese lleno de mimos, amor y energía.

A la señora Nancy, don Marcos y señora Anita, por su cuidado y por siempre estar para alguno cuando lo necesitábamos.

Agradezco a todos los profesores de Fisiopatología por su constante guía y enseñanza en especial al Dr. Ivan y la Dra. Raquel.

ÍNDICE

ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
1. RESUMEN.....	xi
2. ABSTRACT	xiii
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1. Cáncer a nivel mundial y en Chile.....	1
3.2. Cáncer Colorrectal.....	3
3.3. Detección del cáncer colorrectal.	6
3.4. Marcadores de detección.....	9
3.4.1. Inflamación crónica, TNF- α y carcinogénesis colorrectal.....	9
3.4.2. Dislipidemia y LDL oxidada en la carcinogénesis colorrectal.	11
3.5 . Vías de transducción de señales sensibles a especies reactivas del oxígeno.....	12
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	16
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS.....	20
6.1 Objetivo General:.....	20
6.2 Objetivos Específicos:.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1. Concentraciones de trabajo y proliferación celular.....	21
7.1.1. Líneas celulares.....	21
7.1.2. Cultivo de líneas celulares.....	22
7.1.3. Tratamientos con TNF- α y LDL oxidada.	23
7.1.4. Ensayo de proliferación celular mediante INCUCYTE S3 Live-Cell Analysis System.....	23
7.2. Medición de especies reactivas del oxígeno mediante sonda H ₂ DCFDA.....	24
7.3. Análisis de proteínas fosforiladas mediante Western blot.	24
7.3.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	24
7.3.2. Electroforesis de gel de poliacrilamida y Western blot.	26

7.4. Ensayo de viabilidad celular mediante reducción de MTT en presencia de inhibidores de señalización.....	28
8. RESULTADOS	30
8.1. Evaluación del efecto de los tratamientos en la proliferación de líneas celulares de CCR.....	30
8.2. Medición de especies reactivas del oxígeno.....	39
8.3. Análisis de proteínas fosforiladas AKT y β -catenina.....	43
8.4. Inhibición de PI3K/AKT y WNT/ β -catenina reduce la viabilidad inducida por co-tratamiento en las líneas celulares COLO320 y SW620.....	46
9. DISCUSIÓN	49
9.1. El co-tratamiento entre ox-LDL y TNF- α produce sinergismo y aumenta la proliferación celular en la línea COLO320.....	49
9.2. El co-tratamiento con ox-LDL y TNF- α aumenta la formación de especies reactivas del oxígeno en las líneas COLO320 y SW620.....	52
10. CONCLUSIONES	60
11. GLOSARIO	61
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
13. ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos Primarios. <i>Elaboración propia.</i>	27
Tabla 2. Anticuerpos Secundarios. <i>Elaboración propia.</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de las lesiones en el colon.	4
Figura 2. Modelo propuesto de activación de vías PI3K/AKT y WNT/β-catenina por la acción sinérgica de ox-LDL y TNF-α.	18
Figura 3. Ensayo de proliferación celular en la línea de CCR COLO320.	32
Figura 4. Ensayo de proliferación celular en la línea de CCR SW620.	34
Figura 5. Ensayo de proliferación celular en la línea de CCR HT-29.	36
Figura 6. Crecimiento celular de líneas de cáncer colorrectal vistas desde Incucyte.	38
Figura 7. Ensayo medición especies reactivas del oxígeno en líneas celulares de (CCR).	42
Figura 8. Efecto de co-tratamiento de ox-LDL y TNF-α sobre la activación de AKT y β-catenina.	45
Figura 9. Efecto de la inhibición de las vías PI3K/AKT y WNT/ β-catenina en la viabilidad de células de CCR COLO320 y SW620.	48
Figura 10. Efecto de inhibidores en las vías de señalización en la viabilidad celular de COLO320 y SW620.	68

1. RESUMEN

A nivel global, el cáncer colorrectal sigue siendo una de las principales causas de mortalidad. Diversos factores de riesgo se han asociado a su desarrollo, entre ellos la obesidad, la cual está estrechamente relacionada con procesos inflamatorios y trastornos metabólicos como la dislipidemia. Esto favorece la generación de un microambiente tumoral proinflamatorio, caracterizado por niveles elevados de ox-LDL y TNF- α . En este estudio se analizó el efecto sinérgico entre ox-LDL y TNF- α sobre la activación de vías de señalización intracelular sensibles a especies redox WNT/ β -catenina y PI3K/AKT, implicadas en la regulación de la proliferación celular en líneas de cáncer colorrectal. Para ello, se utilizaron dos líneas celulares de cáncer colorrectal, COLO320 y SW620, que fueron tratadas con distintas concentraciones de ox-LDL y TNF- α y combinados. Se evaluó el efecto proliferativo inducido por el sinergismo, así como la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), la fosforilación de proteínas involucradas en las vías mencionadas, y la viabilidad celular bajo condiciones de inhibición de dichas rutas de señalización. Se determinó que, el co-tratamiento con ox-LDL y TNF- α aumentó significativamente la proliferación celular en la línea COLO320, acompañado de un incremento en la generación de ROS en ambas líneas celulares. Aunque no se demostró un aumento significativo en la fosforilación de AKT o β -catenina tras el co-tratamiento, la inhibición de las vías WNT/ β -catenina y PI3K/AKT generó efectos diferenciales entre ambas líneas, sugiriendo una activación heterogénea y dependiente del contexto molecular. Estos resultados podrían contribuir al desarrollo de terapias mas

efectivas, avanzando hacia aplicaciones traslacionales con proyección clínica y biotecnológica.

2. ABSTRACT

Globally, colorectal cancer remains one of the leading causes of mortality. Various risk factors have been associated with its development, including obesity, which is closely linked to inflammatory processes and metabolic disorders such as dyslipidemia. This promotes the generation of a proinflammatory tumor microenvironment, characterized by elevated levels of ox-LDL and TNF- α . In this study, we analyzed the synergistic effect of ox-LDL and TNF- α on the activation of intracellular redox-sensitive signaling pathways, specifically WNT/ β -catenin and PI3K/AKT, which are involved in the regulation of cell proliferation in colorectal cancer cell lines. Two colorectal cancer cell lines, COLO320 and SW620, were used and treated with various concentrations of ox-LDL, TNF- α , and their combination. The study evaluated the proliferative effect induced by the synergism, as well as the production of reactive oxygen species (ROS), the phosphorylation of key proteins within the mentioned pathways, and cell viability under conditions of pathway inhibition.

It was found that the combined treatment with ox-LDL and TNF- α significantly increased cell proliferation in the COLO320 line and promoted ROS generation in both cell lines. Although a clear increase in the

phosphorylation of AKT or β -catenin following cotreatment could not be demonstrated, inhibition of the WNT/ β -catenin and PI3K/AKT pathways showed differential effects between the two lines, suggesting a heterogeneous and context-dependent activation.

These findings may contribute to the development of more effective therapies, advancing toward translational applications with clinical and biotechnological potential.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Cáncer a nivel mundial y en Chile.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como una proliferación descontrolada de células anormales que pueden invadir tejidos circundantes y diseminarse a otras partes del cuerpo, fenómeno conocido como metástasis. Esta capacidad de diseminación representa una de las principales causas de muerte asociadas a la enfermedad (World Health Organization, 2022).

A nivel mundial, el cáncer continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. En 2022, se estimaron aproximadamente 20 millones de nuevos casos y cerca de 9,7 millones de muertes por cáncer. Los tipos de cáncer más diagnosticados fueron el cáncer de pulmón (2,5 millones de casos), seguido por el cáncer de mama (2,3 millones), el cáncer colorrectal (1,9 millones), el cáncer de próstata (1,5 millones) y el cáncer gástrico (970 mil casos) (Globocan, 2022b; World Health Organization, 2024). Estas cifras reflejan no solo la persistente carga global del cáncer, sino también los desafíos en términos de prevención, diagnóstico y tratamiento, especialmente en países de ingresos medios y bajos (World Health Organization, 2024).

En el contexto nacional, Chile no ha sido ajeno a esta realidad. De acuerdo con los registros del observatorio mundial del cáncer, durante el año 2022 se registraron aproximadamente 59.000 nuevos diagnósticos de cáncer, mientras que las muertes por esta causa ascendieron a más de 31.000. Los tipos de cáncer más prevalentes fueron el de próstata, colorrectal, mama, estómago y pulmón, en ese orden (Globocan, 2022a). Respecto a la mortalidad general en Chile, el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) y el DEIS señalan que en 2022 las enfermedades del sistema cardiovascular se mantuvieron como la principal causa de muerte, representando el 26,4 % del total de defunciones. Sin embargo, los tumores malignos ocuparon el segundo lugar, con un 26,1 %, lo que representa una carga significativa para el sistema de salud nacional (Instituto Nacional de Estadística, 2022).

El cáncer colorrectal ha mostrado un aumento progresivo tanto en su incidencia como en la mortalidad en los últimos años. Según datos del Ministerio de Salud y los antecedentes recopilados entre 2013 y 2018, el cáncer colorrectal ha pasado a ocupar el primer lugar en términos de mortalidad entre los cánceres del tracto gastrointestinal, y el tercer lugar dentro de todas las causas de muerte por cáncer en el país (Salud, 2019). Este

fenómeno ha motivado su inclusión prioritaria en el Plan Nacional del Cáncer 2022-2027, el cual busca fortalecer la vigilancia epidemiológica y mejorar el acceso a programas de detección precoz y tratamiento oportuno (Salud, 2022).

3.2. Cáncer Colorrectal.

El cáncer colorrectal (CCR) se define como una neoplasia maligna que se origina en el epitelio del colon o del recto. En la mayoría de los casos, el CCR se desarrolla a partir de lesiones precursoras denominadas pólipos adenomatosos, los cuales pueden localizarse en cualquier segmento del intestino grueso, desde la válvula ileocecal hasta el recto (figura 1). La progresión de estos pólipos hacia adenocarcinomas invasivos es un proceso de múltiples etapas que involucra alteraciones genéticas y epigenéticas acumulativas (Fleming y col., 2012; Kuipers y col., 2015; Zhu y Li, 2023).

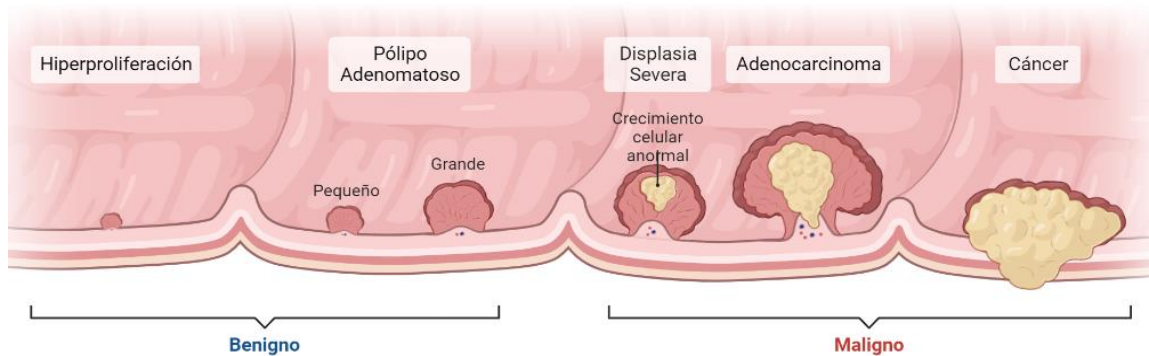


Figura 1. Evolución de las lesiones en el colon.

El proceso comienza con la hiperproliferación benigna y los pólipos adenomatosos y continúa hasta la displasia severa y el desarrollo de cáncer colorrectal maligno (Zhu y Li, 2023).

Desde el punto de vista histopatológico, más del 90% de los casos de CCR corresponden a adenocarcinomas derivados de células epiteliales de la mucosa colorrectal. Estos se clasifican según su grado de diferenciación en bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados, basándose en la formación glandular observada en el tejido tumoral. La mayoría de los adenocarcinomas colorrectales son moderadamente diferenciados, mostrando entre un 50% y un 95% de formación glandular (Fleming y col., 2012; Kuipers y col., 2015).

En términos etiológicos, aproximadamente el 60-65% de los casos de CCR son esporádicos, es decir, no presentan antecedentes familiares ni mutaciones genéticas hereditarias identificables. Diversos factores de riesgo se han asociado con el desarrollo de CCR esporádico, incluyendo enfermedades

inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina e hipertensión arterial (Durko y Malecka-Panas, 2014; Johnson y col., 2013; Rumińska y col., 2015). Además, estudios recientes han identificado la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) como un factor de riesgo emergente para el CCR de aparición temprana (Lee y col., 2022).

Por otro lado, se estima que entre el 25% y el 30% de los casos de CCR presentan un componente hereditario. Dentro de este grupo, aproximadamente el 5-10% se atribuye a síndromes hereditarios bien definidos, como el síndrome de Lynch, la poliposis adenomatosa familiar (FAP), la poliposis asociada a MUTYH (MAP), el síndrome de Peutz-Jeghers, la poliposis serrada y la poliposis juvenil. Estos síndromes están asociados con mutaciones germinales en genes específicos que aumentan significativamente el riesgo de desarrollar CCR (Goosenberg, 2025; Keum y Giovannucci, 2019).

El síndrome de Lynch, también conocido como CCR hereditario no polipósico (HNPCC), es causado por mutaciones en genes de reparación de errores de apareamiento del ADN, como MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. La

FAP es resultado de mutaciones en el gen APC, llevando al desarrollo de cientos a miles de pólipos adenomatosos en el colon y recto. La MAP se debe a mutaciones bialélicas en el gen MUTYH, mientras que el síndrome de Peutz-Jeghers está asociado con mutaciones en el gen STK11. La poliposis serrada y la poliposis juvenil están relacionadas con mutaciones en los genes BRAF, KRAS, SMAD4 y BMPR1A, respectivamente (Carballal y col., 2013; Goosenberg, 2025; Keum y Giovannucci, 2019).

Dada la alta incidencia y mortalidad asociadas al CCR, especialmente en etapas avanzadas, es crucial implementar estrategias de detección temprana y prevención. La identificación de individuos en riesgo, tanto por factores ambientales como genéticos, permite la adopción de medidas preventivas y terapéuticas oportunas, mejorando así el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes.

3.3. Detección del cáncer colorrectal.

La detección precoz del CCR es relevante para prevenir su alta mortalidad, ya que aproximadamente el 45% de las personas diagnosticadas fallecen a causa de esta enfermedad, en gran parte debido a un diagnóstico tardío (American Cancer Society, 2025). Existen múltiples métodos de tamizaje,

tanto invasivos como no invasivos, cada uno con ventajas y limitaciones que determinan su aplicabilidad según el contexto clínico y epidemiológico.

Entre ellos, las pruebas mayormente invasivas, que incluyen:

La colonoscopia, considerada el estándar principal en la detección del CCR debido a su alta sensibilidad (>95%) para lesiones precancerosas y malignas. Además, permite la resección de pólipos durante el procedimiento, lo que añade un valor terapéutico (Bretthauer y col., 2022). No obstante, su implementación masiva se ve limitada por la necesidad de preparación intestinal, sedación, mayor costo y recursos humanos especializados (Schreuders y col., 2015; Simon, 2016).

La prueba Sigmoidoscopia flexible, una técnica que permite examinar hasta el colon sigmoide, siendo menos invasiva que la colonoscopia. Su sensibilidad alcanza aproximadamente el 70% para cánceres ubicados en el área accesible al instrumento, aunque no permite una evaluación completa del colon (Schreuders y col., 2015; Simon, 2016).

Por otra parte, se realizan pruebas no invasivas, que incluyen:

La denominada examen de sangre oculta en deposiciones (SOD), un método que detecta la presencia de hemoglobina en heces mediante una reacción con

guayaco, si la detección es positiva se genera un color azul. Su sensibilidad para detectar CCR oscila entre 65% y 80%, con una especificidad de 78%-90% (Elsafi y col., 2015). Sin embargo, requiere de restricciones dietéticas previas y múltiples muestras, factores que afectan la adherencia (Schreuders y col., 2015; Simon, 2016).

Para la prueba inmunoquímica fecal (FIT) se utilizan anticuerpos monoclonales contra la hemoglobina humana, sin necesidad de restricciones alimentarias. Su sensibilidad alcanza el 91% y la especificidad ronda el 90%, siendo más precisa que la SOD para detectar sangrado de origen colorrectal (Schreuders y col., 2015; Simon, 2016) .

La elección del método de detección debe ajustarse al riesgo individual del paciente, su historial médico y las características del sistema de salud. En poblaciones de riesgo promedio, las pruebas no invasivas son útiles para tamizajes periódicos. En cambio, en pacientes de alto riesgo o con resultados positivos en pruebas fecales, se recomienda colonoscopia como examen confirmatorio. La implementación efectiva de programas de tamizaje ha demostrado reducir significativamente la mortalidad por CCR. Por tanto, detectar la enfermedad en etapas tempranas incrementa la tasa de

supervivencia a cinco años a cerca del 90%, frente al 13% en casos diagnosticados en fases avanzadas (Siegel y col., 2023).

3.4. Marcadores de detección.

3.4.1. Inflamación crónica, TNF- α y carcinogénesis colorrectal.

La inflamación crónica de bajo grado, característica de la obesidad y el sobrepeso, desempeña un papel crucial en la patogénesis del CCR. Este estado inflamatorio persistente se asocia con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conduce a daño en el ADN, proteínas y lípidos, promoviendo así la carcinogénesis (Wlodarczyk y Nowicka, 2019). El desequilibrio entre la generación de ROS y la capacidad antioxidante del organismo, conocido como estrés oxidativo, es un factor clave en este proceso. La deficiencia de antioxidantes como las vitaminas A, E y β -caroteno agrava este desequilibrio, aumentando la susceptibilidad al daño celular y al desarrollo tumoral, incluido el CCR (Crespo-Sanjuan y col., 2015).

El TNF- α , una citocina proinflamatoria producida principalmente por macrófagos y células del tejido adiposo, que está implicada en múltiples etapas de la carcinogénesis colorrectal. Además, TNF- α induce la expresión

de enzimas pro-oxidantes como la NADPH oxidasa, aumentando la producción de ROS y perpetuando el ciclo de daño oxidativo e inflamación (Morgan y Liu, 2011).

En Chile, la prevalencia de sobrepeso y obesidad ha alcanzado niveles alarmantes. Según datos recientes, aproximadamente el 64% de la población adulta presenta algún grado de exceso de peso, lo que incrementa el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles, incluido el CCR. El índice de masa corporal (IMC) es la herramienta más utilizada para clasificar el sobrepeso ($IMC \geq 25$) y la obesidad ($IMC \geq 30$), siendo un predictor importante de riesgo para dislipidemias y otras comorbilidades asociadas (Ministerio de Salud, 2017).

La dislipidemia, caracterizada por niveles anormales de lípidos en sangre, es común en individuos con sobrepeso u obesidad. Estudios recientes indican que entre el 60% y el 70% de las personas obesas presentan dislipidemia, lo que se asocia con un aumento en la formación de pólipos colorrectales, lesiones precursoras del CCR (Feingold y Grunfeld, 2023). La obesidad abdominal, en particular, se ha vinculado significativamente con un mayor

riesgo de desarrollo de pólipos, destacando la importancia de la distribución de la grasa corporal en la evaluación del riesgo oncológico (Yu y col., 2010). En conjunto, estos hallazgos subrayan la interconexión entre la inflamación crónica inducida por la obesidad, el estrés oxidativo y la activación de mediadores proinflamatorios como el TNF- α en la promoción y progresión del cáncer colorrectal. La comprensión de estos mecanismos es esencial para el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas dirigidas a reducir la carga de esta enfermedad.

3.4.2. Dislipidemia y LDL oxidada en la carcinogénesis colorrectal.

La dislipidemia se define como un conjunto de alteraciones en los lípidos plasmáticos, incluyendo niveles elevados de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos y/o niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Esta condición se asocia estrechamente con enfermedades cardiovasculares y ha sido implicada en procesos inflamatorios crónicos que pueden contribuir al desarrollo de neoplasias, incluido el CCR (Ministerio de Salud, 2017).

La LDL, al ser rica en ácidos grasos poliinsaturados, es particularmente susceptible a la oxidación en presencia de ROS, generando ox-LDL. Esta

forma oxidada de LDL no es reconocida por los receptores clásicos de LDL, sino que interactúa con receptores de tipo *scavenger*, como LOX-1, CD36 y MSR1, presentes en diversas células, incluyendo las del epitelio colónico (Gonzalez-Horta y col., 2024). La unión de ox-LDL a estos receptores induce la generación adicional de ROS, activando vías de señalización intracelular que promueven la proliferación celular, la inflamación y la inhibición de la apoptosis, procesos clave en la carcinogénesis (González-Horta y col., 2022)

En conjunto, la dislipidemia y la presencia de ox-LDL desempeñan un papel crucial en la promoción de un microambiente proinflamatorio y prooxidativo en el colon, facilitando la progresión del CCR. La comprensión de estos mecanismos es esencial para el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas dirigidas a reducir la carga de esta enfermedad.

3.5 . Vías de transducción de señales sensibles a especies reactivas del oxígeno.

Las especies reactivas del oxígeno tienen una función dual en las células, actuando como segundos mensajeros en la señalización celular y, en concentraciones elevadas, induciendo daño oxidativo. En el contexto del cáncer colorrectal, la producción de ROS está estrechamente relacionada con

la activación de vías de señalización que promueven la proliferación celular y la supervivencia, contribuyendo así a la tumorigénesis (Catalano y col., 2025).

Uno de los principales mecanismos de generación de ROS en las células epiteliales del colon es la activación de la enzima NADPH oxidasa 1 (NOX1). Esta enzima está compuesta por subunidades funcionales como p22^{phox}, NOXA1 (activadora) y NOXO1 (organizadora), que son críticas para su ensamblaje y funcionamiento (Maghzal y col., 2012; Touyz y col., 2011). El producto primario de NOX1 es el anión superóxido (O_2^-), el cual es rápidamente convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por diversas isoformas de superóxido dismutasa (SOD1 citosólica, SOD2 mitocondrial y SOD3 extracelular) (Ocejo, 2019).

Mecanismos redox-dependientes: La vía PI3K/AKT es una de las principales rutas de señalización involucradas en la proliferación y supervivencia celular. PI3K fosforila lípidos de membrana generando PIP3, que activa AKT, promoviendo la transcripción de genes anti-apoptóticos y la inhibición de proteínas pro-apoptóticas (Itoh y col., 2002; Lu y col., 2011). Esta vía es modulada por ROS en dos niveles: por un lado, AKT puede

fosforilar componentes de NOX, aumentando la producción de ROS; por otro lado, el H₂O₂ generado puede oxidar e inhibir PTEN, lo que eleva los niveles de PIP3, generando hiperactivación de AKT (Koundouros y Pouligiannis, 2018).

Estudios en células de colon y neutrófilos humanos han demostrado que la inhibición de PI3K reduce significativamente la actividad de NOX1, confirmando la retroalimentación positiva entre ambas rutas (Chen y col., 2001).

La vía WNT/ β -catenina es otra vía crítica en la regulación de la proliferación celular (Freese y col., 2010). En condiciones fisiológicas, β -catenina es degradada por un complejo formado por APC, Axin y GSK3 β . Mutaciones en APC, comunes en CCR esporádico, impiden esta degradación y promueven la acumulación nuclear de β -catenina, lo que lleva a la activación de genes proliferativos como c-Myc y ciclina D1 (Brabletz y col., 2000; Fodde y col., 2001). La producción de ROS por NOX1 modula esta vía a través de la oxidación de nucleoredoxina (NRX), una proteína que normalmente se une a Dishevelled (Dvl) para inhibir la vía. La oxidación de NRX disocia este complejo, permitiendo la activación de β -catenina.

Además, el H₂O₂ generado por NOX1 puede inactivar PTEN, generando una sinergia funcional con la vía PI3K/AKT, que promueve la fosforilación de β-catenina en residuos específicos, facilitando su translocación nuclear (He y col., 2007; Lee y col., 2002; Simpson y Parsons, 2001)

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El problema principal que aborda este trabajo radica en que no existen estudios concluyentes sobre la posible acción sinérgica entre ox-LDL y TNF- α en la proliferación celular del cáncer colorrectal, especialmente considerando que ambos factores están elevados en pacientes obesos, y que Chile presenta una alta prevalencia de obesidad y sobrepeso. Este contexto sugiere que el estrés oxidativo y la inflamación crónica podrían desempeñar un papel clave en el desarrollo del CCR, pero los mecanismos subyacentes no han sido completamente esclarecidos (figura 2).

Nuestra investigación se focaliza en este vacío, analizando si la interacción entre ox-LDL y TNF- α activa vías de señalización celular sensibles a especies reactivas de oxígeno, como WNT/ β -catenina y PI3K/AKT. Estas vías están estrechamente vinculadas a la proliferación celular y podrían estar moduladas por el ambiente inflamatorio y oxidativo característico de la obesidad.

La solución propuesta consiste en dilucidar cómo el ambiente proinflamatorio y oxidativo contribuye a la activación de vías de señalización sensibles a especies reactivas de oxígeno, como WNT/ β -catenina y

PI3K/AKT, y a la proliferación celular en el CCR, con el fin de proponer el uso de ox-LDL y TNF- α como biomarcadores clave para el diagnóstico precoz de esta enfermedad, mejorando así las posibilidades de intervención oportuna.

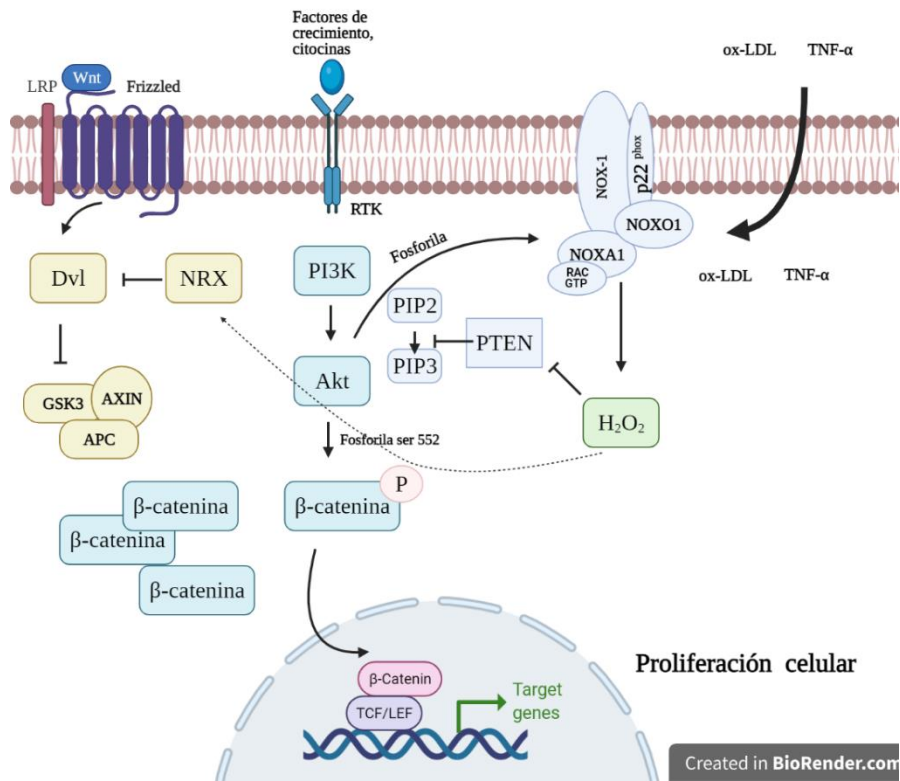


Figura 2. Modelo propuesto de activación de vías PI3K/AKT y WNT/ β -catenina por la acción sinérgica de ox-LDL y TNF- α .

La internalización de ox-LDL y TNF- α induce la formación de especies reactivas del oxígeno desde NOX-1. La formación de ROS inhibe a PTEN promoviendo una cascada de desregulación que incluye la acumulación de PIP3, lo que conlleva a la hiper-fosforilación de AKT provocando la fosforilación de NOX-1 y β -catenina. La fosforilación de β -catenina en una serina específica provoca su traslocación al núcleo para la activación de factores de transcripción para genes de proliferación celular. Por otro lado, especies reactivas del oxígeno pueden oxidar NRX disociándolo de Dvl provocando la estabilización de β -catenina y suprimiendo los complejos de destrucción translocándola al núcleo. *Fuente: elaboración propia.*

5. HIPÓTESIS

La acción sinérgica entre ox-LDL y TNF- α induce la activación de las vías de señalización intracelular sensibles a especies redox WNT/ β -catenina y PI3K/AKT, involucradas en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer colorrectal.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto sinérgico entre ox-LDL y TNF- α en la activación de las vías de señalización intracelular WNT/ β -catenina y PI3K/AKT y su relación con la proliferación celular en líneas celulares de cáncer colorrectal.

6.2 Objetivos Específicos:

- I. Evaluar la formación de especies reactivas del oxígeno mediada por la acción sinérgica entre ox-LDL y TNF- α en las líneas celulares de CCR COLO320, SW620 y HT-29.
- II. Analizar la fosforilación de proteínas involucradas en las vías de señalización intracelular WNT/ β -catenina y PI3K/AKT mediada por la acción sinérgica entre ox-LDL y TNF- α en modelos celulares de CCR.
- III. Estudiar el efecto de inhibición de las vías de señalización intracelular WNT/ β -catenina y PI3K/AK, mediada por la acción sinérgica entre ox-LDL y TNF- α , en la proliferación en modelos celulares de CCR.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Concentraciones de trabajo y proliferación celular.

7.1.1. Líneas celulares.

- **HT-29** (ATCC HTB-38): Es una línea celular epitelial humana derivada de un adenocarcinoma colorrectal primario de una mujer caucásica de 44 años, en 1964. Morfológicamente, presenta características epiteliales y crece en monocapas densas no polarizadas, pero puede adquirir una morfología polarizada y diferenciada con borde en cepillo bajo condiciones de cultivo específicas o mediante tratamiento con inductores. Genéticamente, posee mutaciones comunes en CCR, incluyendo TP53 mutado y BRAF V600E, y es inestable a nivel microsatelital (MSI-low), convirtiéndola en un modelo relevante para investigar mecanismos de progresión tumoral, señalización celular y respuesta farmacológica en CCR.

- **COLO320** (ATCC CCL-220): Es una línea celular derivada de un adenocarcinoma colorrectal metastásico de una mujer caucásica de 61 años, en 1976. Presenta una morfología celular redondeada y refráctil, crecen en suspensión o como agregados laxos, sin formar monocapas ni estructuras epiteliales organizadas. Funcionalmente, exhibe características de tipo

neuroendocrino, y genéticamente, carece de mutaciones en genes comúnmente alterados en CCR como KRAS, BRAF y presentando estabilidad microsatelital (MSS, por sus siglas en ingles).

-SW620 (ATCC CCL-227): Es una línea celular humana establecida a partir de una metástasis ganglionar de adenocarcinoma colorrectal de un paciente masculino de 51 años, en 1975. Morfológicamente, SW620 presenta una forma epitelial con crecimiento adherente en monocapas irregulares. Se caracteriza por su origen metastásico, lo que le confiere un fenotipo más agresivo comparado con líneas derivadas del tumor primario como SW480. Genéticamente, presenta mutaciones en KRAS (G12V), TP53, y APC, además de inestabilidad cromosómica, siendo clasificada como MSS (microsatellite stable). Esta línea celular es ampliamente utilizada como modelo de cáncer colorrectal avanzado para estudios de invasión, migración, resistencia a fármacos y transición epitelio-mesénquima (EMT).

7.1.2. Cultivo de líneas celulares.

Las tres líneas celulares de CCR humano se cultivaron en placas de 100 mm en medio de cultivo DMEM (para las líneas celulares HT-29 y SW620) y RPMI (para la línea celular COLO320), suplementadas con suero bovino fetal (SFB) al 10% (v/v), 1mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100

$\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina y bajo condiciones estándares de cultivo (5% de CO_2 a $37\text{ }^\circ\text{C}$) (según protocolo del laboratorio).

7.1.3. Tratamientos con TNF- α y LDL oxidada.

Las células de CCR fueron incubadas con concentraciones de TNF- α (0, 10, 15, ng/mL) y concentraciones de ox-LDL (0, 6,25, 12,5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$) en medio con suero fetal bovino al 2% (v/v) durante 24, 48, 72 y 94 h para los ensayos de proliferación celular. Los co-tratamientos se llevaron a cabo incubando las células con concentraciones combinadas de ox-LDL y TNF- α (protocolo (Keum y Giovannucci, 2019) modificado de tesis Doctoral de González-Horta)

7.1.4. Ensayo de proliferación celular mediante INCUCYTE S3 Live-Cell Analysis System.

Las células de CCR se sembraron a una densidad de 5×10^3 células por pozo en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 h. Posteriormente, se llevaron a cabo los tratamientos experimentales durante un período adicional de 24 h. La evaluación de las células se realizó a las 24, 48, 72 y 96 h después del tratamiento, siguiendo el protocolo 7.3.1 establecido. La proliferación

celular se cuantificó mediante el sistema de análisis de células vivas INCUCYTE S3 (protocolo modificado de (Vera y col., 2024)).

7.2. Medición de especies reactivas del oxígeno mediante sonda

H₂DCFDA.

Las líneas celulares de CCR fueron sembradas a una densidad de $5,5 \times 10^4$ células por pozo en placas de 96 pocillos de fondo transparente y paredes oscuras en DMEM y RPMI sin rojo fenol, suplementadas con un 10% (v/v) de suero fetal bovino, y se cultivaron a 37°C durante 24 h. Después de este período, se realizó la incubación con el inhibidor de NOX1 (ML171) durante 1 h para luego agregar la sonda H₂DCFDA durante 30 min. Posteriormente, se retiró la sonda y se aplicaron los tratamientos de ox-LDL, TNF- α y los co-tratamientos correspondientes. La medición de ROS se realizó mediante fluorimetría utilizando el equipo Synergy HTX multi-mode reader (BIOTEK, EE. UU.) (protocolo modificado de (Shen y col., 2013)).

7.3. Análisis de proteínas fosforiladas mediante Western blot.

7.3.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales.

Las proteínas totales fueron obtenidas a partir de cultivos celulares sembrados en placas de 6 pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo y

cultivadas durante 24 h. Luego se procedió a la incubación con el inhibidor de la vía PI3K/AKT Copanlisib 10 nM (Cayman, 20354) durante 1 h. Posterior a eso se realizaron tratamientos con ox-LDL, TNF- α , co-tratamientos en medio DMEM y RPMI sin suero fetal bovino durante 45 min para COLO320 y 1 h para SW620. Seguidamente la monocapa celular fue lavada con PBS y las proteínas totales se extrajeron utilizando 150 μ L de solución de lisis RIPA (ThermoFisher Scientific, 89901), suplementada con un cóctel de inhibidores de proteasas (ThermoFisher Scientific, 78430) e inhibidores de fosfatasa (ThermoFisher Scientific, 78420).

El lisado celular se incubó durante 5 min en hielo, luego se trasvasó a tubos eppendorf de 1,5 mL, seguido de una centrifugación durante 15 min a 14.000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf y la cuantificación de proteínas totales se determinó utilizando el método de BCA a una longitud de onda de 562 nm, utilizando el kit de cuantificación de proteínas Pierce™ BCA™ (ThermoFisher Scientific, 23225). Se utilizó una curva de calibración de BSA con un rango de concentraciones de proteínas desde 125 hasta 2000 μ g/mL (protocolo modificado de fabricante y experimentos previos de laboratorio)

7.3.2. Electroforesis de gel de poliacrilamida y Western blot.

Las proteínas totales ya cuantificadas se mezclaron con tampón de carga (en una cantidad de 40 µg de proteínas totales), seguido de una desnaturalización a 95 °C durante 15 min. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% (v/v) y se aplicaron las muestras en el equipo de electroforesis, utilizando 100V en tampón Tris-glicina (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1 % (p/v) de SDS, pH 8,3, BM-0540).

Para transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa, se utilizó el equipo de transferencia semiseco Trans-Blot Turbo (BioRad, EE. UU.) y tampón de transferencia (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 20% (v/v) de metanol, pH 8,3) durante 30 min. La transferencia fue confirmada mediante tinción de las membranas con una solución de rojo Ponceau al 0,5 % (p/v).

Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% (p/v) en TBS (20 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,6) a 25 °C. Posteriormente, se incubaron las membranas durante 14 h a 4 °C en agitación con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 1), diluidos en buffer TBS (20 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,6, 2% (p/v) de leche, 0,1 % (v/v) de Tween 20).

Tabla 1. Anticuerpos Primarios. *Elaboración propia.*

Especificidad	Proveedor	N.º catálogo	Especie	Dilución
Anti β-catenina	Cell Signal	8480S	Conejo	1/1000
Total				
Anti β-catenina	Cell Signal	5651S	Conejo	1/1000
Fosforilada				
Anti-AKT	Cell Signal	9272S	Conejo	1/1000
Total				
Anti-AKT	Cell Signal	4060S	Mouse	1/1000
fosforilada				

Al día siguiente y después de tres lavados de 10 min con solución de lavado (0,1 % (v/v) de Tween20, 0,01 % (p/v) de SDS disuelto en TBS), las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 2) en agitación. Se repitieron los tres lavados de 10 min y se reveló la señal de fluorescencia utilizando el equipo Odyssey CLx a longitudes de onda de 680 nm y 790 nm (protocolo modificado de experimentos previos de laboratorio).

Tabla 2. Anticuerpos Secundarios. Elaboración propia

Especificidad	Proveedor	N.º catálogo	Especie	Dilución
Anti-Ratón Alexa Fluor 790	Jackson	715-655-150	burro	1/30000
Anti-Ratón Alexa Fluor 680	Jackson	715-625-150	burro	1/30000
Anti-Conejo Alexa Fluor 790	Jackson	711-655-152	burro	1/30000
Anti-Conejo Alexa Fluor 680	Jackson	711-655-152	burro	1/30000

7.4. Ensayo de viabilidad celular mediante reducción de MTT en presencia de inhibidores de señalización.

Las células de CCR se sembraron a razón de $7,5 \times 10^3$ células por pozo en placas de 96 pocillos y se crecieron por 24 h a 37 °C. Las líneas celulares fueron tratadas con las concentraciones correspondientes de TNF- α , ox-LDL y co-tratamientos, además, se utilizó inhibidor de la vía PI3K/AKT Copanlisib a 30 nM y de WNT/ β -catenina LF3 a 10 μ M (Abcam, ab287122) en medio con 2 % (v/v) de SFB por 94 h. Pasadas 3 horas se añadió 10 μ L de 5 mg/mL de MTT (ThermoFisher Scientific, M6494) y se incubó por 3 h a 37 °C. Los cristales formados de formazán se solubilizaron con 100 μ L de

isopropanol acídico (0,01 M de HCl) por 15 min a 37 °C. Se determinó la absorbancia a $\lambda=570$ nm en espectrofotómetro (protocolo modificando desde fabricante y experimentos previos de laboratorio).

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación del efecto de los tratamientos en la proliferación de líneas celulares de CCR.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la ox-LDL y el TNF- α en la proliferación de células de CCR, se realizaron tratamientos *in vitro* por un período de 94 h. Se aplicaron concentraciones variables de ox-LDL (0-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y TNF- α (0-15 ng/mL), tanto de forma individual como en combinación.

En la línea celular COLO320, en el co-tratamiento se observó un aumento estadísticamente significativo en la proliferación celular en las siguientes condiciones: con 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL + 15 ng/mL TNF- α a partir de las 48 h (Fig. 3B), con 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL + 15 ng/mL TNF- α que comienza a las 94 h (Fig. 3D), con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL + 15 ng/mL TNF- α desde las 72 h (Fig. 3F). Esto sugiere una respuesta proliferativa inducida por TNF- α y ox-LDL en ciertas condiciones, aunque sin alcanzar umbrales de significancia estadística en todas las combinaciones en el ensayo.

En los tratamientos individuales como con TNF- α a una concentración de 10 ng/mL produjo un aumento en la proliferación celular a partir de las 48 h de incubación (Fig. 3A, 3C, 3E y 3G). No obstante, dicho incremento no resultó estadísticamente significativo en comparación con el grupo control. Al emplear una concentración de 15 ng/mL de TNF- α , se observó un aumento en la proliferación celular a las 72 h (Fig. 3B); sin embargo, este efecto no se observó en otras condiciones experimentales tratadas con la misma concentración (Fig. 3D, 3F, 3H).

Por otra parte, las células tratadas con ox-LDL a una concentración de 12,5 μ g/mL mostraron una tendencia al aumento de la proliferación a partir de las 72 h, aunque sin diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Fig. 3C y 3D). En contraste, las concentraciones de 6,25, 25 y 50 μ g/mL de ox-LDL no mostraron diferencias en la proliferación celular.

Los resultados observados en la línea celular COLO320 indican que a concentraciones bajas de ox-LDL (6,25-25 μ g/mL), cuando se evalúa el efecto sinérgico con 15 ng/mL de TNF- α , se observa un aumento significativo en la proliferación celular.

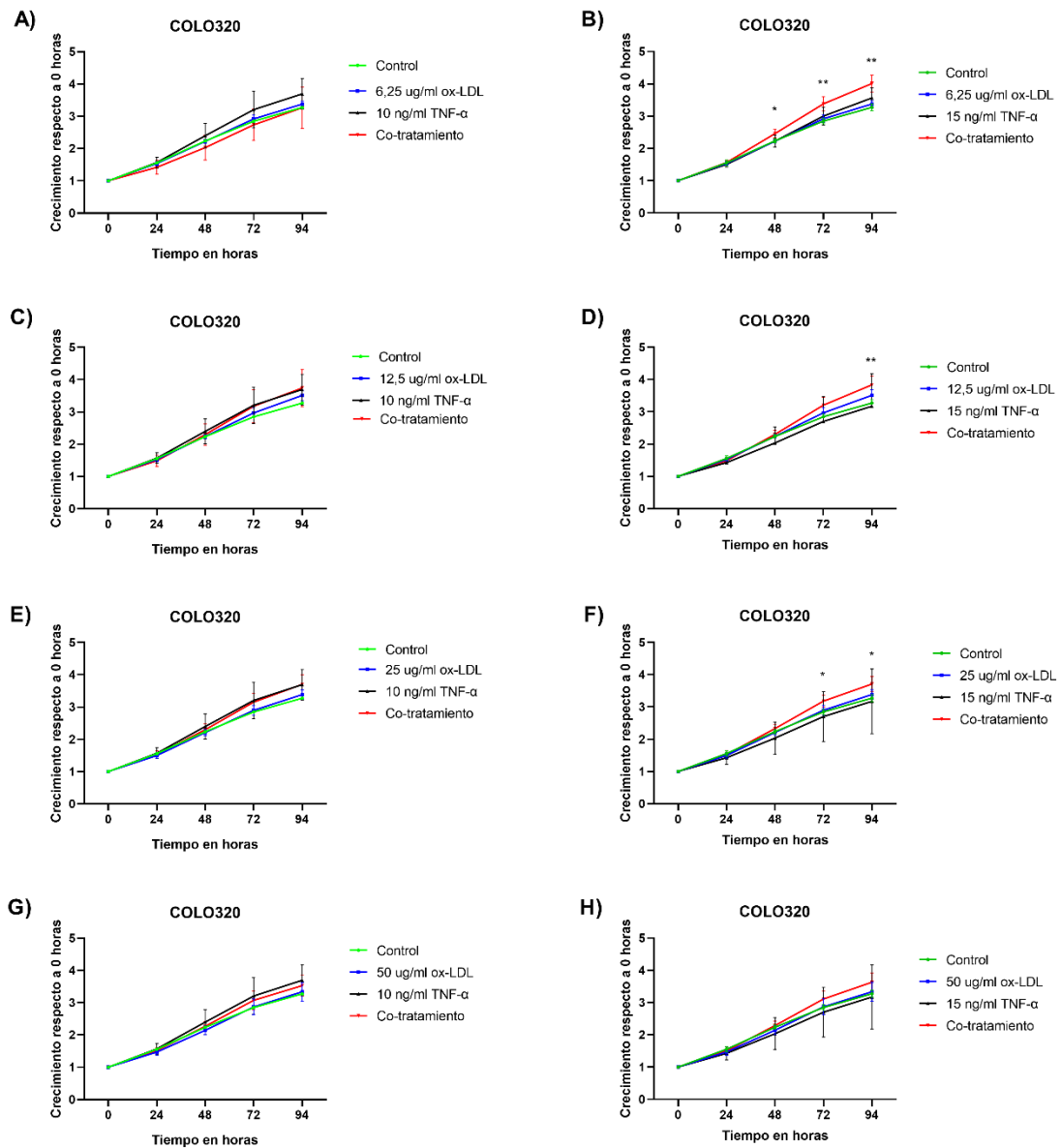


Figura 3. Ensayo de proliferación celular en la línea de CCR COLO320.

Las células fueron tratadas con ox-LDL, TNF- α y co-tratamientos durante 24, 48, 72 y 94 h. Cada condición se realizó por triplicado. Los puntos representan la media \pm desviación estándar (SD), con n=6. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se indican significancias con * p<0,05, ** p<0,01.

Respecto a los co-tratamientos en la línea celular SW620, no se observó ningún efecto proliferativo adicional en 7 de 8 combinaciones, solo en el co-tratamiento con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ox-LDL más TNF- α a 10 ng/mL (Fig. 4E) se observó una leve tendencia al incremento en la proliferación celular a partir de las 72 h, aunque sin diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

El tratamiento con TNF- α a concentraciones de 15 ng/mL y 10 ng/mL no indujo aumento estadísticamente significativo en la proliferación celular respecto al control (Fig. 4A-H). En relación con los tratamientos individuales con ox-LDL, las concentraciones de 6,25, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no provocaron un aumento relevante en la proliferación celular en comparación con el control (Fig. 4A, 4B, 4E, 4F, 4G y 4H). En cambio, el tratamiento con 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ox-LDL mostró una leve tendencia al incremento de la proliferación celular a partir de las 72 h; sin embargo, esta tampoco fue estadísticamente significativa (Fig. 4D).

Los resultados observados en la línea celular SW620 indican que podría existir un aumento proliferativo pero que no es estadísticamente significativo

al menos en esta evaluación. Además, este efecto sería menor en magnitud que el observado en la línea COLO320.

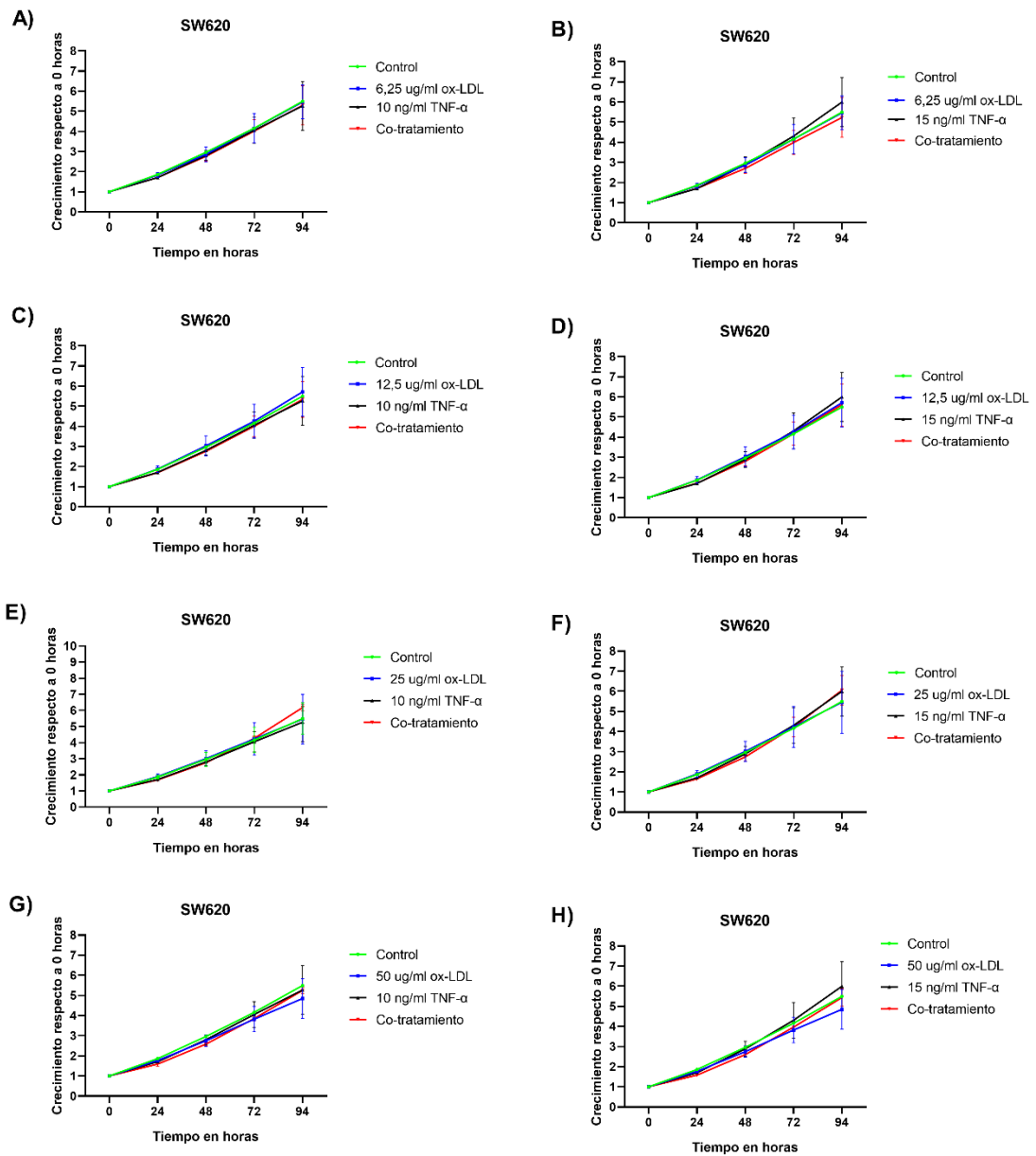


Figura 4. Ensayo de proliferación celular en la línea de CCR SW620.

Las células fueron tratadas con ox-LDL, TNF- α y co-tratamientos durante 24, 48, 72 y 94. (A-I) corresponde a los diferentes tratamientos individuales de ox-LDL, TNF- α y co-tratamientos utilizados. Los puntos representan la media \pm desviación estándar (SD), con n=6. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Por último, en la línea celular HT-29, ninguno de los tratamientos aplicados indujo un aumento en la proliferación celular respecto al control (fig. 5A a 5H). Sin obstante, se puede observó un efecto inhibitorio a las 24 horas en los co-tratamientos con 6,25 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL + 15 ng/mL TNF- α , con 12,5 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL + 10 ng/mL TNF- α y con 12,5 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL + 15 ng/mL TNF- α respecto al control. (Fig. 5B, 5C y 5D).

En base a los resultados obtenidos, se decidió continuar trabajando solo con las líneas celulares COLO320 y SW620.

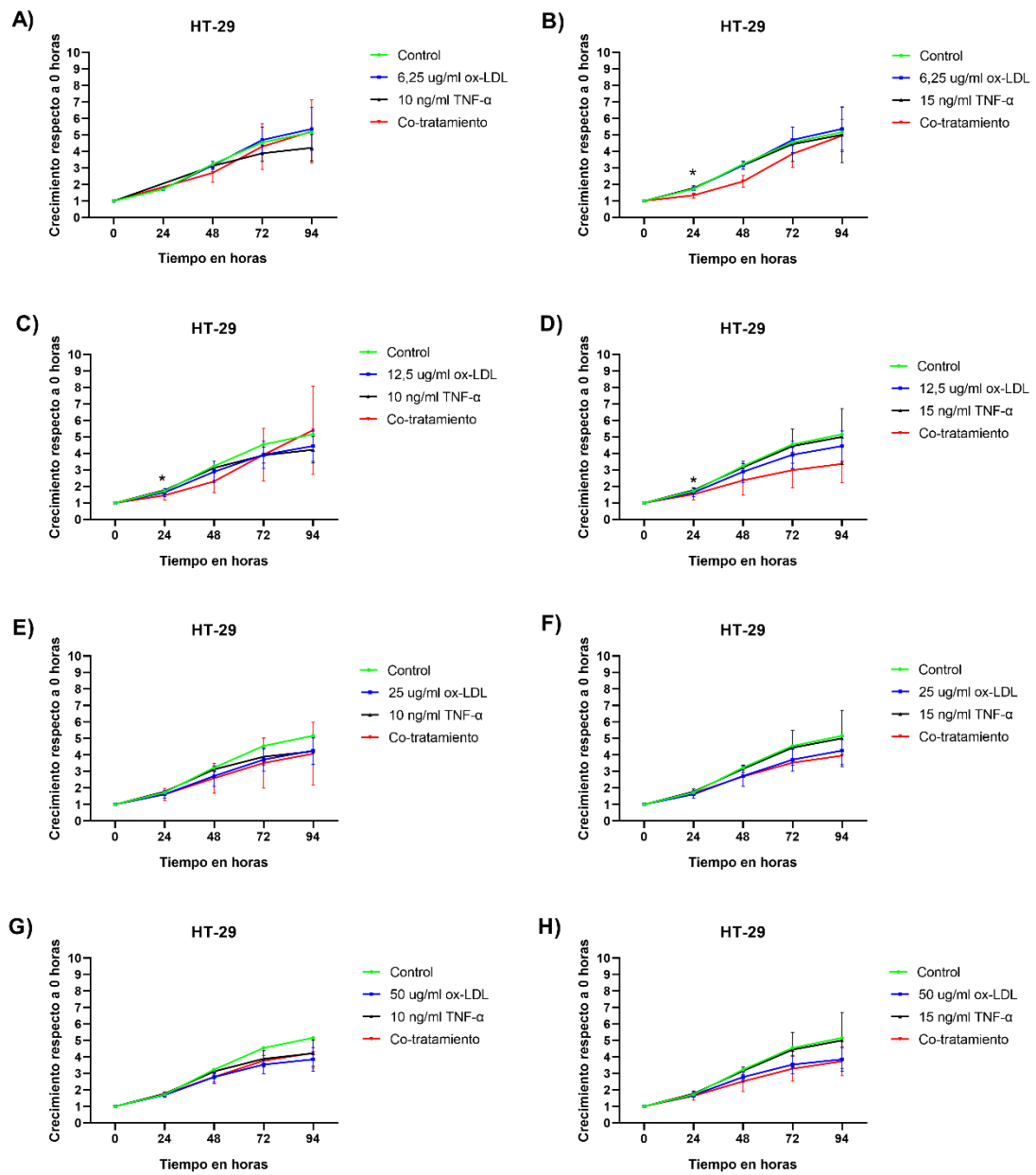
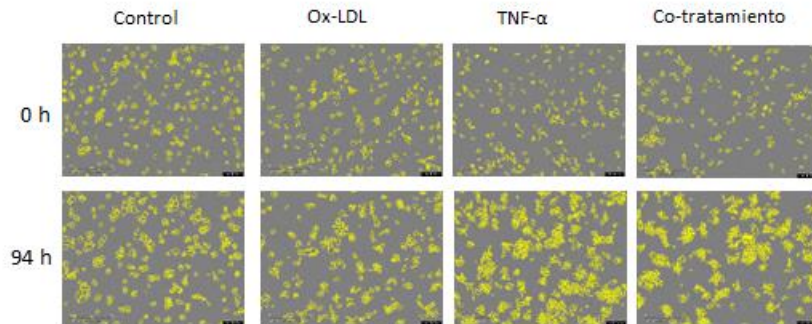


Figura 5. Ensayo de proliferación celular en la línea de CCR HT-29.

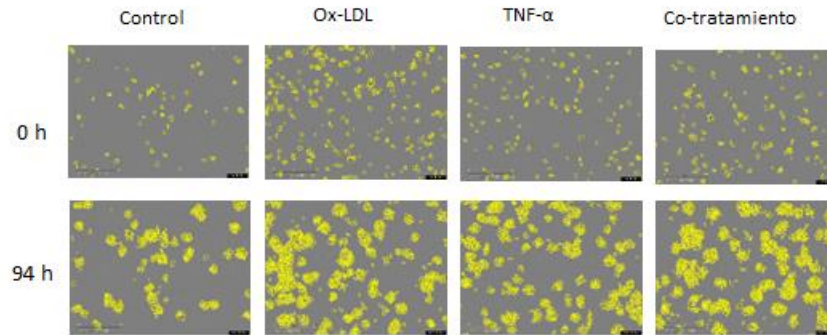
Las células fueron tratadas con LDL oxidada, TNF- α y co-tratamientos durante 24, 48, 72 y 94 h. Los puntos representan la media \pm desviación estándar (SD), con n=6. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Para dar una imagen detallada de como cada tratamiento y co-tratamiento afectaba la proliferación, se tomaron fotos de cada una de las líneas celulares. La línea COLO320 presenta un cambio marcado en la confluencia entre las 0 h y las 94 h en respuesta a cada tratamiento (Fig. 6A). En el caso de la línea celular SW620, si bien la variación en la confluencia entre tratamientos no es tan pronunciada como en COLO320, se observa un aumento en la proliferación en los tratamientos en comparación con el control (Fig. 6B) En contraste, la línea celular HT-29 fue descartada, ya que no cumplió con los criterios de sinergismo requeridos en ninguno de los co-tratamientos, lo que impidió su avance a los siguientes experimentos (Fig. 6C)

A) COLO320 - 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL + 15 ng/mL TNF- α



B) SW620 - 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL+ 10 ng/mL TNF- α



C) HT-29 - 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL + 10 ng/mL TNF- α

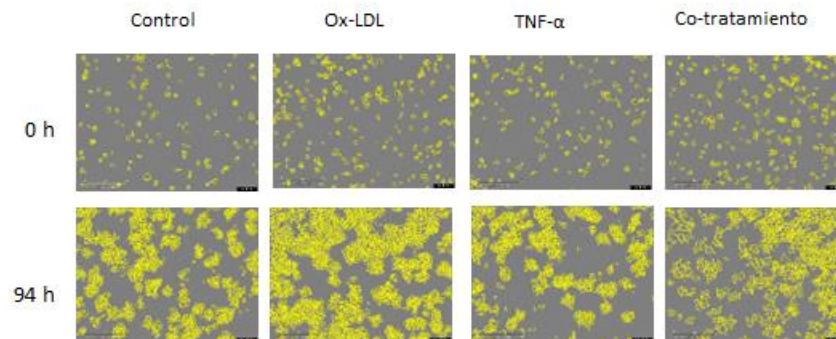


Figura 6. Crecimiento celular de líneas de cáncer colorrectal vistas desde Incucyte.

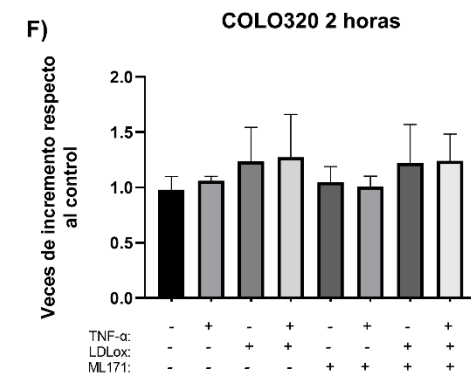
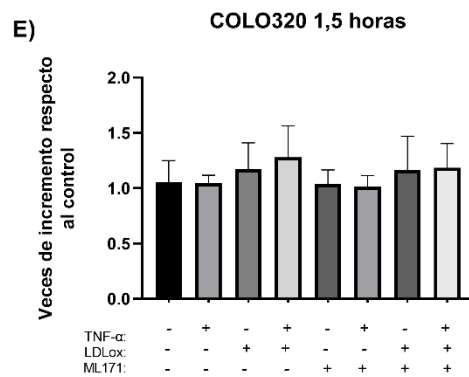
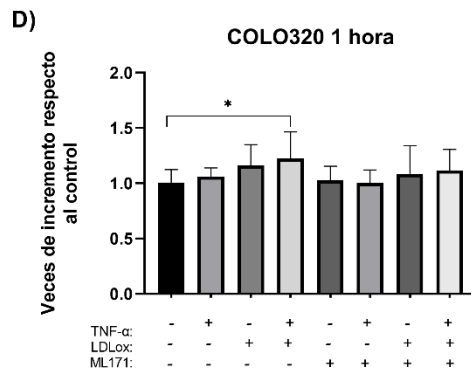
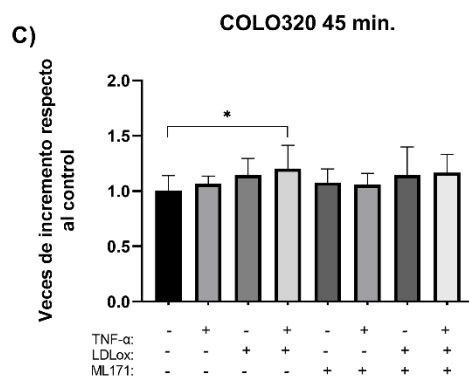
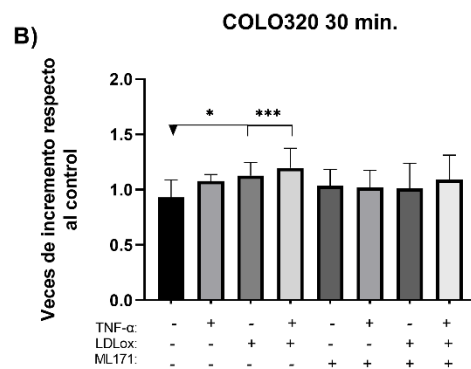
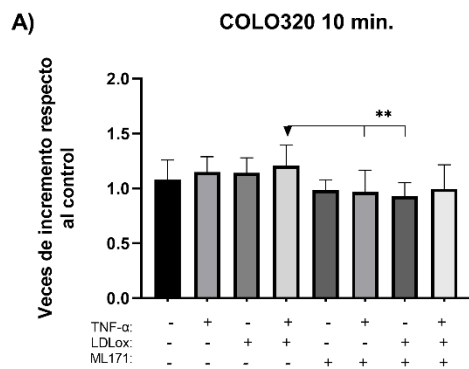
Microfotográficas de líneas celulares de cáncer colorrectal, obtenidas por aumento 10x a las 0 y 94 h, barra de escala 1,25 μm . Las células fueron tratadas con ox-LDL, TNF- α y co-tratamientos

8.2. Medición de especies reactivas del oxígeno.

La medición de las especies reactivas del oxígeno se llevó a cabo mediante la utilización de la sonda H₂DCFDA, inhibiendo NOX1 con ML171 para proceder a la incubación con los tratamientos seleccionados y su medición en un intervalo de tiempo de 2 h para cada línea celular. En la línea celular COLO320, el co-tratamiento indujo un aumento significativo en los niveles de ROS a los 30 min (Fig. 7B) y 45 min (Fig. 7C), así como a 1 h post incubación (Fig. 7D), con incrementos de 2,7, 2,0, 2,2 veces, respectivamente, en comparación con el control. Si bien a los 10 min (Fig. 7A), así como a las 1,5 h (Fig. 7E) y 2 h (Fig. 7F), se observó una tendencia al aumento en la formación de ROS, estas no resultan ser estadísticamente significativas con respecto al control. En cuanto a los tratamientos individuales, también se detectó aumento en los niveles de ROS, aunque sin significancia estadística. Por otro lado, la co-incubación con el inhibidor ML171 indujo una reducción no significativa en los niveles de ROS a los 10 min (Fig. 7A); sin embargo, esta disminución fue transitoria, ya que los niveles de ROS se incrementaron nuevamente con el tiempo.

En el caso de la línea celular SW620, el co-tratamiento indujo un aumento significativo en los niveles de ROS a los 45 min (Fig. 7I), 1 h (Fig. 7J), 1,5 h

(Fig. 7K) post incubación, con incrementos de 2,8, 2,4 y 3,1 veces, respectivamente, en comparación al control. En cuanto a los tratamientos individuales, solo ox-LDL provocó un aumento en los niveles de ROS; sin embargo, este no alcanzó significancia estadística frente al control. La co-incubación del inhibidor ML171 con el co-tratamiento resultó en una disminución significativa de los niveles de ROS a los 10 (Fig. 7G), 30 (Fig. 7H) y 45 min (Fig. 7I), así como a 1, 1,5 y 2 h post incubación en comparación con el co-tratamiento sin inhibidor (Fig. 7J, 7K, 7L). Asimismo, la co-incubación de ML171 con ox-LDL produjo una reducción significativa de ROS a los 45 min, 1 h y 1,5 h, en comparación con el tratamiento con ox-LDL solo (Fig. 7I, 7J, 7K).



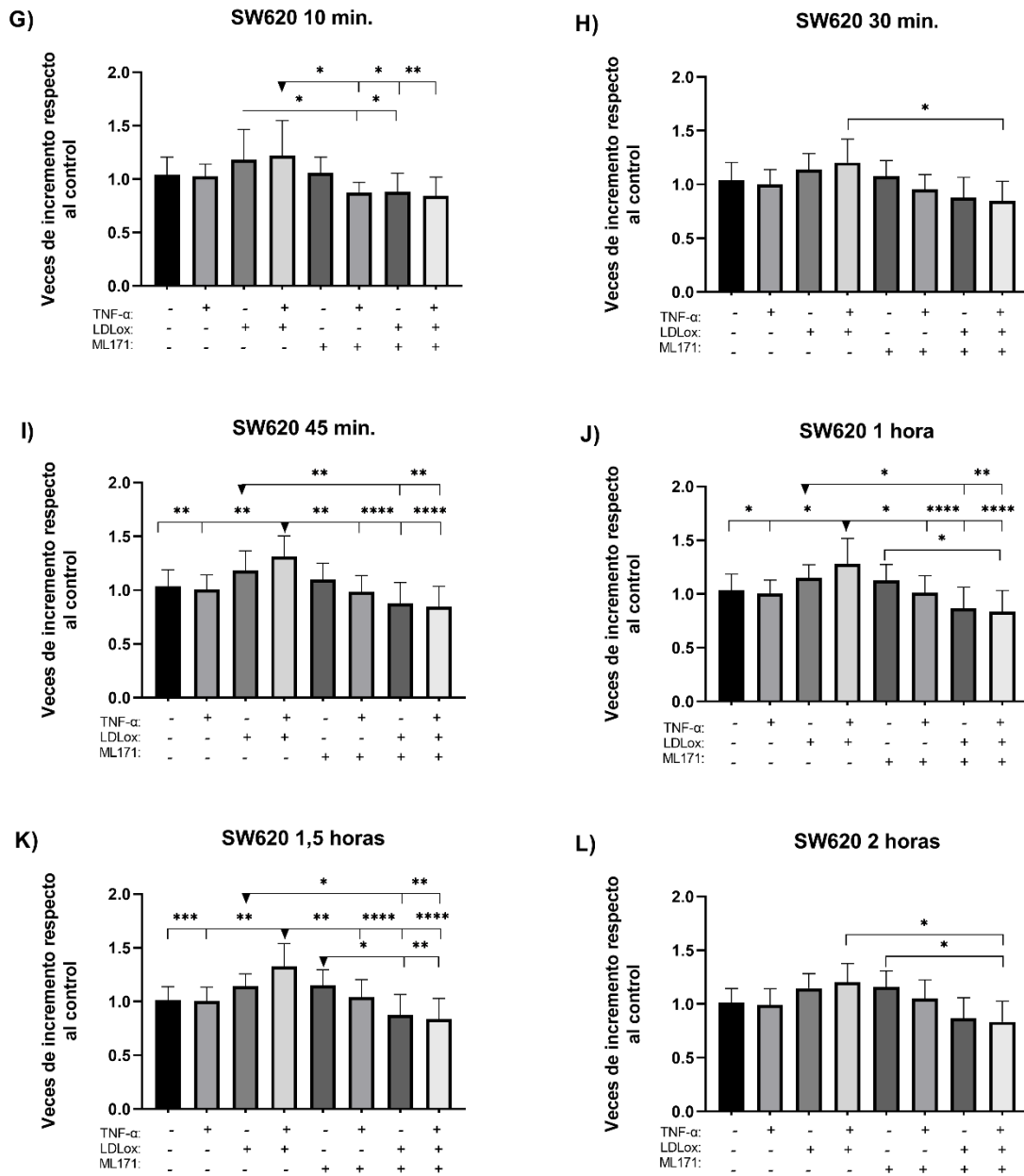


Figura 7. Ensayo medición especies reactivas del oxígeno en líneas celulares de (CCR). Las células fueron tratadas con ox-LDL, TNF- α y medidos a diferentes tiempos con la sonda H₂DCFDA. (A-F) corresponden a la línea celular COLO320. (G-L) corresponden a la línea celular SW620. Las barras representan la media \pm SD, n=9. Prueba ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples tukey y prueba de Kruskal-Wallis y test de comparaciones múltiples de Dunn. Se indican significancias con * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0.001 y **** p<0.0001.

8.3. Análisis de proteínas fosforiladas AKT y β -catenina.

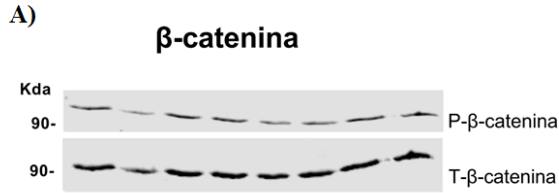
Para analizar si el aumento de ROS estaba involucrado en la fosforilación y activación de proteínas de las vías de transducción de señales sensibles a especies redox WNT/ β -catenina y PI3K/AKT, se realizó la detección de las proteínas fosforiladas y totales AKT y β -catenina a través de western blot. Los tratamientos se realizaron en placas de 6 pozos y se incubaron por 1 h con las concentraciones seleccionadas anteriormente.

En la línea celular COLO320, no se observó el aumento de la fosforilación de β -catenina bajo el co-tratamiento ni con los tratamientos individuales. Asimismo, la co-incubación con el inhibidor Copanlisib no produjo una disminución significativa en los niveles de β -catenina fosforilada, lo que sugiere que, en esta línea celular, la vía WNT/ β -catenina no se encuentra activamente regulada por estos estímulos en las condiciones evaluadas (Fig. 8A). En cuanto a AKT, no fue posible detectar la forma fosforilada de la proteína en ninguna condición experimental, lo que impidió realizar un análisis de activación de esta vía. Sin embargo, se observó la presencia de AKT total, aunque no se pudo realizar un análisis estadístico por falta de

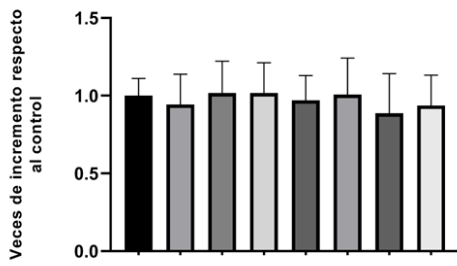
réplicas, se evidencio una disminución aparente de niveles de AKT total tras el tratamiento con el inhibidor Copanlisib (Fig. 8B).

En cuanto a la línea celular SW620 los niveles de β -catenina total y fosforilada solo se expresaron como intensidades relativas. No se observó un aumento o disminución en los niveles de β -catenina (Fig. 8C). Como se cuenta solo un experimento, no fue posible realizar análisis estadístico. Por otra parte, el análisis de AKT total y fosforilado no se evidenció un aumento significativo en la fosforilación de AKT en respuesta al co-tratamiento. Asimismo, la co-incubacion con el inhibidor Copanlisib no produjo una disminución significativa en los niveles de AKT fosforilado, lo que sugiere que, en esta línea celular, la activación de la vía PI3K/AKT no se ve afectada bajo las condiciones experimentales que se utilizaron (Fig. 8D).

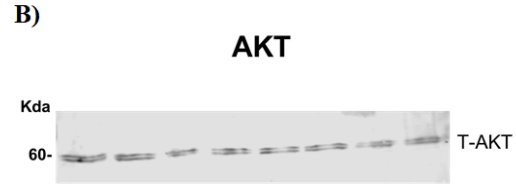
COLO320



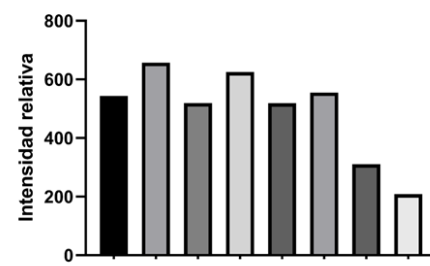
TNF-α:	-	-	+	+	-	-	+	+
ox-LDL:	-	+	-	+	-	+	-	+
Copanlisib:	-	-	-	-	+	+	+	+



TNF-α:	-	-	+	+	-	-	+	+
ox-LDL:	-	+	-	+	-	+	-	+
Copanlisib:	-	-	-	-	+	+	+	+

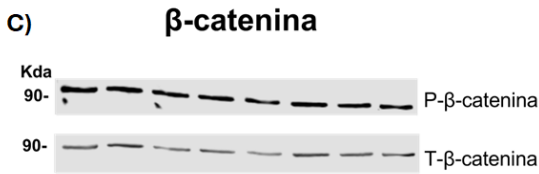


TNF-α:	-	-	+	+	-	-	+	+
ox-LDL:	-	+	-	+	-	+	-	+
Copanlisib:	-	-	-	-	+	+	+	+

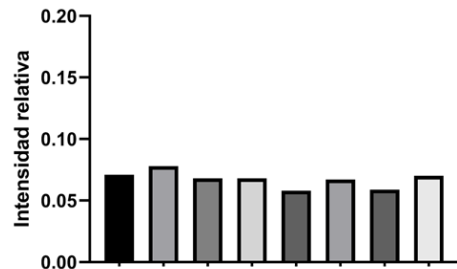


TNF-α:	-	-	+	+	-	-	+	+
ox-LDL:	-	+	-	+	-	+	-	+
Copanlisib:	-	-	-	-	+	+	+	+

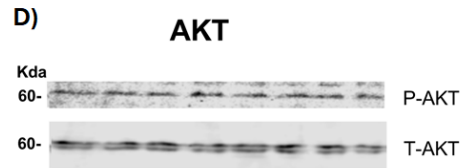
SW620



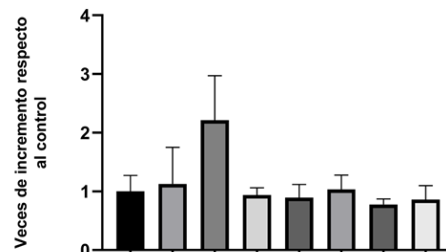
TNF-α:	-	-	+	+	-	-	+	+
ox-LDL:	-	+	-	+	-	+	-	+
Copanlisib:	-	-	-	-	+	+	+	+



TNF-α:	-	-	+	+	-	-	+	+
ox-LDL:	-	+	-	+	-	+	-	+
Copanlisib:	-	-	-	-	+	+	+	+



TNF-α:	-	-	+	+	-	-	+	+
ox-LDL:	-	+	-	+	-	+	-	+
Copanlisib:	-	-	-	-	+	+	+	+



TNF-α:	-	-	+	+	-	-	+	+
ox-LDL:	-	+	-	+	-	+	-	+
Copanlisib:	-	-	-	-	+	+	+	+

Figura 8. Efecto de co-tratamiento de ox-LDL y TNF-α sobre la activación de AKT y β-catenina.

(A y B) Corresponden a la línea celular COLO320 tratadas con 6,25 $\mu\text{g/ml}$ de ox-LDL y 15 ng/ml de TNF- α . (C y D) corresponden a la línea celular SW620 tratadas con 25 $\mu\text{g/ml}$ de ox-LDL y 10 ng/ml de TNF- α . Ambas líneas fueron tratadas con el inhibidor Copanlisib a 20 μM . Cada condición se ensayó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=3. Prueba Anova de una vía y test de comparaciones múltiples tukey.

8.4. Inhibición de PI3K/AKT y WNT/ β -catenina reduce la viabilidad

inducida por co-tratamiento en las líneas celulares COLO320 y SW620.

Con el objetivo de evaluar el efecto del co-tratamiento y su modulación mediante inhibidores específicos de las vías de transducción de señales PI3K/AKT y WNT/ β -catenina, se realizó un ensayo de viabilidad celular (MTT) en las líneas COLO320 y SW620. Para ello, se utilizaron los inhibidores LF3 (10 μM) y Copanlisib (30 nM), tanto de forma individual como en combinación con el co-tratamiento durante 72 h.

En la línea COLO320, se observó una disminución significativa de la viabilidad celular entre el co-tratamiento y la combinación con los inhibidores. En específico, al comparar directamente el co-tratamiento con las condiciones inhibitorias, se observó una tendencia a la disminución de viabilidad celular en presencia de LF3, aunque sin alcanzar significancia estadística. En contraste, la combinación de LF3 con el co-tratamiento disminuyó la viabilidad celular 1,51 veces (Fig. 9A).

Por su parte, el tratamiento con Copanlisib generó un efecto aún más marcado, disminuyendo 2,35 veces la viabilidad celular respecto al co-tratamiento. Esta tendencia se mantuvo al combinar Copanlisib con el co-tratamiento, disminuyendo la viabilidad 1,65 veces y alcanzando su efecto máximo en la triple combinación de LF3 + Copanlisib + co-tratamiento donde se observó una disminución de 2,48 veces en comparación al co-tratamiento solo (Fig. 9A).

A pesar de que el co-tratamiento mostró una tendencia a la disminución de la viabilidad celular través de MTT, esta no fue estadísticamente significativa. Se sugiere que el estímulo sinérgico inducido por ox-LDL y TNF- α promueve activación de rutas de proliferación, ya que la sensibilidad del co-tratamiento a la inhibición farmacológica demostrada anteriormente refuerza el rol funcional de las vías PI3K/AKT y WNT/ β -catenina (Fig. 9A).

En contraste, la línea celular SW620 solo presentó una disminución significativa de la viabilidad celular al ser tratada con LF3 + Copanlisib + co-tratamiento, en comparación con el co-tratamiento solo. En esta condición, la viabilidad se redujo aproximadamente 1,32 veces, lo que indica una sensibilidad moderada a la inhibición simultánea de las vías PI3K/AKT y

WNT/ β -catenina bajo el estímulo combinado (Fig. 9B).

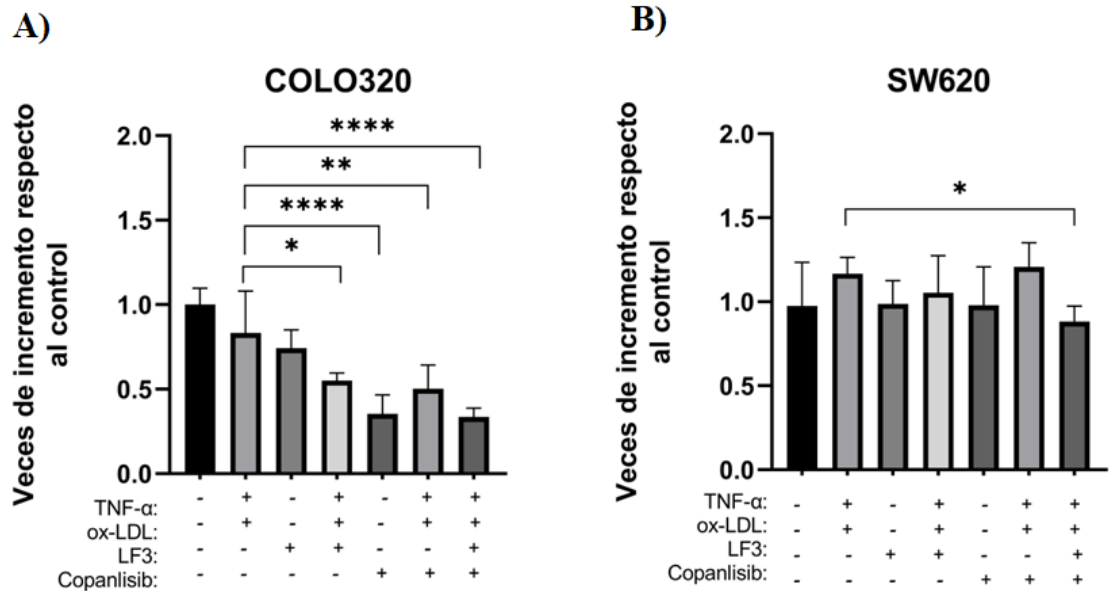


Figura 9. Efecto de la inhibición de las vías PI3K/AKT y WNT/ β -catenina en la viabilidad de células de CCR COLO320 y SW620.

Las células fueron tratadas con 6,25 μ g/ml de ox-LDL y 15 ng/ml de TNF- α para COLO320 y 25 μ g/ml de ox-LDL y 10 ng/ml de TNF- α , inhibidor Copanlisib a 30 μ M e inhibidor LF3 a 10 nM. Las barras representan la media \pm SD, n=6. Prueba Anova de una vía y test de comparaciones múltiples tukey. Se indican significancias con * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0.001 y **** p<0.0001.

9. DISCUSIÓN

Diversos factores de riesgo están asociados al desarrollo de CCR, en particular la obesidad se ha relacionado estrechamente con procesos inflamatorios y alteraciones metabólicas como la dislipidemia (Ionescu y col., 2023). Lo anterior promueve la generación de un microambiente tumoral proinflamatorio, caracterizado por niveles elevados de TNF- α y ox-LDL. En este contexto, la presente tesis evaluó el efecto sinérgico, con el objetivo de comprender su impacto sobre la proliferación celular en líneas de CCR.

9.1. El co-tratamiento entre ox-LDL y TNF- α produce sinergismo y aumenta la proliferación celular en la línea COLO320.

En esta tesis se evaluó el efecto sinérgico entre ox-LDL y TNF- α sobre la proliferación de líneas de CCR, a través del aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno y la activación de vías de transducción de señales sensibles a ROS. Para ello, se determinaron las concentraciones de trabajo tanto de ox-LDL, TNF- α y en combinación. En cuanto a ox-LDL no hubo citotoxicidad significativa en las concentraciones utilizadas (0-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en las líneas celulares COLO320, SW620 y HT-29. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos en donde concentraciones bajas o

moderadas estimulan la proliferación celular, mientras que concentraciones altas producen citotoxicidad e incluso apoptosis. Esto sugiere un efecto diferencial de citotoxicidad dependiendo del tipo de líneas celulares y la concentración utilizada.

Por ejemplo, en líneas celulares K562 / AO2 (leucemia) y EC9706 (carcinoma esofágico), la proliferación celular disminuye desde los 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ox-LD. En contraste, células no tumorales como las células endoteliales de vena umbilical humana muestran un aumento en la proliferación con el mismo tratamiento (Li y col., 2013). Asimismo, en líneas celulares de cáncer prostático como LNCaP, DU-145 y C4-2 el tratamiento con ox-LDL estimula la proliferación celular entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gonzalez-Chavarria y col., 2014).

En cuanto a $\text{TNF-}\alpha$ no se detectó cambios significativos en la proliferación a concentraciones de 10 y 15 ng/ml en las líneas celulares COLO320, SW620 y HT-29. Sin embargo, en otros estudios realizados en líneas celulares de cáncer colorrectal (HCT116), cáncer de mama (MDA-MB-468 y SK-BR3) y células musculares lisas vasculares (CMLV), se emplearon concentraciones

de trabajo de hasta 20 ng/ml, las cuales no indujeron citotoxicidad, pero sí proliferación celular en algunas líneas.

Con relación al co-tratamiento, se observó un aumento significativo en la proliferación celular en varias combinaciones de co-tratamiento en la línea celular COLO320, así como una tendencia hacia la proliferación en la línea SW620. Respecto a este último hallazgo, la bibliografía solo reporta un estudio en que evaluaron de forma combinada y exógena el efecto de ox-LDL y TNF- α en líneas celulares de cáncer colorrectal, específicamente HCT116 y COLO320. Los resultados de este estudio indicaron que ox-LDL promovió la invasión y migración de las células tumorales, mientras que la co-incubación con TNF- α no mostró un efecto aditivo ni sinérgico apreciable (González-Horta y col., 2022).

Al determinar que el efecto sinérgico entre ox-LDL y TNF- α fue estadísticamente significativo en la línea COLO320 y en la línea SW620 tendía a la proliferación. Por ello, se decidió continuar con los demás experimentos solo con estas dos líneas ya que HT-29 mostraba signos erráticos en su proliferación independiente de los tratamientos utilizados.

9.2. El co-tratamiento con ox-LDL y TNF- α aumenta la formación de especies reactivas del oxígeno en las líneas COLO320 y SW620.

En cuanto al análisis de ROS tanto la línea celular COLO320 como SW620 mostraron desde los 45 min un aumento significativo de ROS al ser tratadas con el co-tratamiento en comparación a los tratamientos individuales. Estudios demuestran que ox-LDL puede unirse a LOX-1 en células tumorales activando a NOX1 para generar ROS a través de vías de señalización como NF-kB, MAPK (Zhang y col., 2025). Por otro lado, también hay estudios en células intestinales que muestran que TNF- α puede estimular la NADP oxidasa a través de NOXO1 y así aumentar la producción de ROS (Kuwano y col., 2008). Tanto ox-LDL como TNF- α son moléculas proinflamatorias que pueden aumentar la producción de ROS por lo que, nuestros resultados son acordes a lo descrito en la literatura.

En relación con inhibición de NOX1 por ML171 al ser tratadas las células con el co-tratamiento, en la línea COLO320, si bien se produjo inhibición de NOX1 y una reducción en la formación de ROS durante los primeros min, este efecto fue compensado posteriormente por la célula. En contraste, en la línea celular SW620, la inhibición de NOX1 y la disminución de ROS se mantuvieron en el tiempo, alcanzando valores estadísticamente

significativos. Por ejemplo, en estudios en células de CCR, ML171 inhibe de manera potente a NOX1 (Gianni y col., 2010), mientras que en estudios realizados con organoides, ML171 solo redujo parcialmente la formación de ROS (Gonzalez-Horta y col., 2024). Esto sugiere que la formación de ROS no se limita exclusivamente a la actividad de NOX1, sino que podrían existir fuentes intracelulares alternativas para su producción o adaptación ya sea vía mitocondrial, por medio de NOX2 o peroxidasas. Otra posible explicación para la falta de inhibición en la línea COLO320 es que la dosis de inhibidor utilizada no haya sido suficiente para contrarrestar la producción de ROS por NOX1 en el tiempo.

9.3. El co-tratamiento con ox-LDL y TNF- α no aumenta la fosforilación de las proteínas AKT y β -catenina.

Se utilizó como referencia el tiempo en el que se observó el aumento más significativo de ROS para realizar los tratamientos correspondientes para los ensayos de Western blot. En la línea celular COLO320, no se visualizó la fosforilación de AKT en Ser473 ni en el control ni en los tratamientos individuales, al igual que en el co-tratamiento. En la línea celular SW620, no se visualizó aumento de la fosforilación de AKT por el co-tratamiento pero

sí al estimular con TNF- α . Estudios sugieren que la no activación de AKT fosforilado en COLO320 es porque expresa mínimamente el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la membrana a diferencia de otras líneas celulares WiDr y Lovo (Bijnsdorp y col., 2010). Asimismo, en células musculares lisas vasculares, ox-LDL fosforila AKT mediante la activación de EGFR (Auge y col., 2002). Por otra parte, en líneas celulares SW1116 y HT-29 al sobre expresar TNFR2, uno de los receptores de TNF- α ligado a señales de supervivencia y proliferación, e inducir el estímulo con TNF- α , aumentaba la fosforilación de AKT y proliferación celular (Zhao y col., 2017).

Estos resultados sugieren que COLO320 podría presentar una activación basal reducida de la vía AKT, con niveles naturalmente bajos de fosforilación difíciles de inducir en ausencia de un co-estímulo potente, como insulina o IGF-1. Esta baja fosforilación también podría explicarse por una escasa expresión del receptor TNFR2. En contraste, la línea SW620 presenta una mayor expresión de TNFR2, lo que permitiría una respuesta más robusta al estímulo con TNF- α y facilitaría la fosforilación de AKT, como se ha reportado previamente (Uhlen, 2015) y se observa en los resultados de esta tesis.

En el caso de COLO320, dado que no se evidencio fosforilación de AKT tras los tratamientos, la inhibición de PI3K mediante Copanlisib mantendría la vía inactiva, aunque los niveles basales de fosforilación ya fueran bajos. De manera similar, en SW620 se observa una disminución de la fosforilación de AKT cuando se trató con Copanlisib en conjunto con TNF- α , lo que confirma la efectividad del inhibidor en esta línea celular.

No se observó aumento en la fosforilación de β -catenina en Ser552 en ninguna de las líneas celulares, COLO320 y SW620, tras el co-tratamiento. La posible explicación para este resultado es que ambas líneas presentan mutaciones truncantes en el gen APC (Liu y col., 2017; Siraj y col., 2020). La pérdida de función de APC conduce a una activación constitutiva de la vía WNT/ β -catenina, lo que resulta en una acumulación citoplasmática y translocación nuclear continua de β -catenina, incluso en ausencia de estímulos exógenos. Bajo estas condiciones estímulos adicionales como el co-tratamiento probablemente no logren potenciar aún más la actividad o fosforilación de β -catenina en Ser552.

Además, nuestro modelo propuso que la activación de β -catenina en Ser552 dependería de la fosforilación previa de AKT en Ser473 y así permitir la

fosforilación de sustratos como β -catenina en Ser552, promoviendo localización nuclear y actividad transcripcional (Fang y col., 2007). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la fosforilación de AKT en Ser473 fue mínima o prácticamente indetectable, lo que concuerda con la ausencia de fosforilación de β -catenina en Ser552 y que la activación de esta proteína se limitaría a la activación previa de AKT a través de esta vía no canónica.

9.4. Efecto diferencial de la inhibición de PI3K/AKT y WNT/ β -catenina sobre la viabilidad celular en líneas de cáncer colorrectal.

Para simplificar la visualización de los resultados, se seleccionaron subconjuntos de datos representativos del comportamiento observado. En el ANEXO 1 se encuentran los gráficos con todos los controles utilizados.

Para evaluar si las vías de señalización PI3K/AKT y WNT/ β -catenina participan en la proliferación celular inducida por el co-tratamiento con ox-LDL y TNF- α , se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante MTT a las 72 h. Las líneas celulares COLO320 y SW320 fueron tratadas con los inhibidores específicos LF3 (inhibidor del complejo β -catenina/TCF4) y

Copanlisib (inhibidor de la vía PI3K/AKT), tanto individualmente como en combinación con el contratamiento.

En la línea COLO320, se observó una disminución significativa de la viabilidad celular tras el tratamiento de ox-LDL + TNF- α con ambos inhibidores ya sea por separado o en conjunto, en comparación con el co-tratamiento. En contraste, la línea SW620, solo se evidenció la disminución de la viabilidad al ser tratada con ambos inhibidores en conjunto al co-tratamiento. Destacando que la magnitud de la inhibición fue diferente entre ambas líneas celulares.

Estas diferencias pueden explicarse por el perfil molecular característico de cada línea. Si bien ambas líneas celulares presentan una mutación truncada en APC, lo que sugiere una activación constitutiva de la vía WNT/ β -catenina, COLO320 muestra una mayor dependencia funcional de esta vía, por lo que el tratamiento con LF3 interrumpe una ruta clave de proliferación. En contraste, SW620 es una línea dependiente de vía KRAS/MAPK (McNew y col., 2016; Singh y col., 2012), lo que le permite mantener su viabilidad incluso tras la inhibición de WNT/ β -catenina, ya que su supervivencia no depende principalmente de esta vía (Chen y col., 2019).

En relación con la inhibición de la vía PI3K/AKT, en COLO320 se observó una reducción significativa en la viabilidad celular tras el tratamiento con Copanlisib y tratamiento combinado de inhibidores, a pesar de no detectarse fosforilación de AKT en Ser473 por Western blot. Este hallazgo podría explicarse por la activación de vías alternativas aguas abajo de PI3K, como la fosforilación de SGK1 mediada por PDK1, que puede mantener la actividad mTORC1 y promover proliferación y supervivencia celular en ausencia de AKT fosforilado, como se ha descrito en otros modelos tumorales (Castel y col., 2016).

En el caso de SW620, el tratamiento con Copanlisib no produjo una disminución significativa en la viabilidad celular, lo que se puede atribuir a su menor sensibilidad a inhibidores de PI3K. Esta resistencia se ha asociado a la presencia de señalización MAPK constitutivamente activa, derivada de su mutación en KRAS, que permite a la célula compensar la inhibición de PI3K mediante vías paralelas (Clarke y col., 2019). Sin Embargo, al tratar con ambos inhibidores junto al co-tratamiento, se logró superar parcialmente esta resistencia, evidenciando un efecto combinado sobre rutas críticas de proliferación y supervivencia.

En resumen, nuestros resultados muestran que la exposición combinada a un entorno inflamatorio y dislipidémico, representado por el co-tratamiento de ox-LDL y TNF- α , promueve un aumento significativo en la proliferación celular en líneas de cáncer colorrectal que presentan mayor sensibilidad al estrés oxidativo inducido por ROS y dependencia funcional de vías de señalización activadas por estímulos exógenos y de su perfil molecular específico.

Si bien los resultados son relevantes, existen algunas limitaciones metodológicas que deben mencionarse como el número de repeticiones experimentales en los Western blot realizados, pudiendo influir directamente en los resultados analizados.

En conjunto, este trabajo también sugiere estrategias de intervención basadas en la combinación de inhibidores de señalización con conocimiento del estado redox celular. Estas aproximaciones podrían contribuir al desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas en cáncer colorrectal, así como a la prevención temprana de esta enfermedad en contextos de inflamación crónica y dislipidemia, avanzando hacia aplicaciones traslacionales con proyección clínica y biotecnológica.

10. CONCLUSIONES

- En conclusión, el co-tratamiento con ox-LDL + TNF- α , a bajas concentraciones, genera un efecto sinérgico que se traduce en un aumento significativo de la proliferación celular en la línea COLO320.
- El co-tratamiento induce un incremento significativo en los niveles de especies reactivas del oxígeno en las líneas celulares de CCR COLO320 y SW620 en comparación con los tratamientos individuales.
- La inhibición diferencial de las vías WNT/ β -catenina y PI3K/AKT podría estar determinada por el perfil molecular de cada línea celular, en particular por la presencia de mutaciones que activan o inactivan constitutivamente estas rutas de señalización.

11. GLOSARIO

APC- Poliposis adenomatosa coli.

IGF-1- Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

LOX-1- Receptor de proteína de baja densidad oxidada.

MAPK- Proteína quinasa activada por mitógenos.

NF- κ B - Factor nuclear kappa B.

NOX2- NADPH oxidasa 2.

PDK1- Fosfoinositido dependiente de kinasa 1.

SGK1- Quinasa 1 inducible por suero y glucocorticoides.

TNFR2- Receptor del factor de necrosis tumoral 2.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Cancer Society. (2025). *Colorectal Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging*. <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging.html>
- Auge, N., Garcia, V., Maupas-Schwalm, F., Levade, T., Salvayre, R., & Negre-Salvayre, A. (2002). Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(12), 1990-1995. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000043453.21629.3b>
- Bijnsdorp, I. V., Kruyt, F. A., Fukushima, M., Smid, K., Gokoel, S., & Peters, G. J. (2010). Molecular mechanism underlying the synergistic interaction between trifluorothymidine and the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in human colorectal cancer cell lines. *Cancer Sci*, 101(2), 440-447. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01375.x>
- Brabletz, T., Herrmann, K., Jung, A., Faller, G., & Kirchner, T. (2000). Expression of Nuclear β -Catenin and c-myc Is Correlated with Tumor Size but Not with Proliferative Activity of Colorectal Adenomas. *The American Journal of Pathology*, 156(3), 865-870. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64955-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64955-3)
- Bretthauer, M., Loberg, M., Wieszczy, P., Kalager, M., Emilsson, L., Garborg, K., Rupinski, M., Dekker, E., Spaander, M., Bugajski, M., Holme, O., Zauber, A. G., Pilonis, N. D., Mroz, A., Kuipers, E. J., Shi, J., Hernan, M. A., Adami, H. O., Regula, J.,...Nord, I. C. C. S. G. (2022). Effect of Colonoscopy Screening on Risks of Colorectal Cancer and Related Death. *N Engl J Med*, 387(17), 1547-1556. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2208375>
- Carballal, S., Moreira, L., & Balaguer, F. (2013). [Serrated polyps and serrated polyposis syndrome]. *Cir Esp*, 91(3), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2012.12.001>
- Castel, P., Ellis, H., Bago, R., Toska, E., Razavi, P., Carmona, F. J., Kannan, S., Verma, C. S., Dickler, M., Chandarlapaty, S., Brogi, E., Alessi, D. R., Baselga, J., & Scaltriti, M. (2016). PDK1-SGK1 Signaling Sustains AKT-Independent mTORC1 Activation and Confers Resistance to PI3Kalpha Inhibition. *Cancer Cell*, 30(2), 229-242. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.004>
- Catalano, T., Selvaggi, F., Cotellese, R., & Aceto, G. M. (2025). The Role of Reactive Oxygen Species in Colorectal Cancer Initiation and Progression: Perspectives on Theranostic Approaches. *Cancers (Basel)*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/cancers17050752>
- Chen, G. T., Tifrea, D. F., Murad, R., Lyou, Y., Mortazavi, A., Edwards, R. A., & Waterman, M. L. (2019). <https://doi.org/10.1101/667030>
- Chen, M., Inoue, K., Narumiya, S., Masaki, T., & Sawamura, T. (2001). Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. *FEBS letters*, 499(3), 215-219.
- Clarke, P. A., Roe, T., Swabey, K., Hobbs, S. M., McAndrew, C., Tomlin, K., Westwood, I., Burke, R., van Montfort, R., & Workman, P. (2019). Dissecting mechanisms of resistance to targeted drug combination therapy in human colorectal cancer. *Oncogene*, 38(25), 5076-5090. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0780-z>
- Crespo-Sanjuan, J., Calvo-Nieves, M. D., Aguirre-Gervas, B., Herreros-Rodriguez, J., Velayos-Jimenez, B., Castro-Alija, M. J., Munoz-Moreno, M. F., Sanchez, D., Zamora-Gonzalez,

- N., Bajo-Graneras, R., Garcia-Centeno, R. M., Largo Cabrerizo, M. E., Bustamante, M. R., & Garrote-Adrados, J. A. (2015). Early detection of high oxidative activity in patients with adenomatous intestinal polyps and colorectal adenocarcinoma: myeloperoxidase and oxidized low-density lipoprotein in serum as new markers of oxidative stress in colorectal cancer. *Lab Med*, 46(2), 123-135.
<https://doi.org/10.1309/LMZJJU6BC86WUDHW>
- Durko, L., & Malecka-Panas, E. (2014). Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 10, 45-54. <https://doi.org/10.1007/s11888-013-0203-4>
- Elsafi, S., Al-Qahtani, N., Zakary, N., & Al Zahrani, E. (2015). The sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios of fecal occult blood test for the detection of colorectal cancer in hospital settings. *Clinical and Experimental Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.2147/ceg.S86419>
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T., & Lu, Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem*, 282(15), 11221-11229.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M611871200>
- Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2023). Obesity and dyslipidemia. *Endotext [Internet]*.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 3(3), 153-173. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030>
- Fodde, R., Smits, R., & Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature reviews cancer*, 1(1), 55-67.
- Freese, J. L., Pino, D., & Pleasure, S. J. (2010). Wnt signaling in development and disease. *Neurobiology of disease*, 38(2), 148-153.
- Gianni, D., Taulet, N., Zhang, H., DerMardirossian, C., Kister, J., Martinez, L., Roush, W. R., Brown, S. J., Bokoch, G. M., & Rosen, H. (2010). A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small-molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *ACS Chem Biol*, 5(10), 981-993.
<https://doi.org/10.1021/cb100219n>
- Globocan. (2022a). *Chile fact sheets*.
<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/152-chile-fact-sheet.pdf>
- Globocan. (2022b). world fact sheets, .
<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/900-world-fact-sheet.pdf>
- Gonzalez-Chavarria, I., Cerro, R. P., Parra, N. P., Sandoval, F. A., Zuniga, F. A., Omazabal, V. A., Lamperti, L. I., Jimenez, S. P., Fernandez, E. A., Gutierrez, N. A., Rodriguez, F. S., Onate, S. A., Sanchez, O., Vera, J. C., & Toledo, J. R. (2014). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is an enhancer of tumor angiogenesis in human prostate cancer cells. *PLoS One*, 9(8), e106219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106219>
- González-Horta, E., Vargas, Y., Burgueño, J., Abreu, M., & Toledo, J. (2022). P-305 Oxidized-LDL promotes colorectal cancer progression and growth of human colonoides. *Annals of Oncology*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.04.394>
- Gonzalez-Horta, E. E., Burgueno, J. F., Leiva, M. J., Villavicencio, C., Kawaguchi, F. I., Hazime, H., Reyes, F., Manrique-Suarez, V., Parra, N. C., Abreu, M. T., & Toledo, J. R. (2024).

- Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Reactive Oxygen Species-Dependent Proliferation of Intestinal Epithelial Cells. *Pharmaceuticals (Basel)*, 17(11).
<https://doi.org/10.3390/ph17111466>
- Goosenberg, K. A., Babiker HM. . (2025). A Review of Hereditary Colorectal Cancers. In S. Publishing (Ed.), *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538195/>
- He, X. C., Yin, T., Grindley, J. C., Tian, Q., Sato, T., Tao, W. A., Dirisina, R., Porter-Westpfahl, K. S., Hembree, M., Johnson, T., Wiedemann, L. M., Barrett, T. A., Hood, L., Wu, H., & Li, L. (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet*, 39(2), 189-198. <https://doi.org/10.1038/ng1928>
- Instituto Nacional de Estadística. (2022). *Anuario de estadísticas vitales*. Retrieved from https://www.ine.gob.cl/docs/default-source/nacimientos-matrimonios-y-defunciones/publicaciones-y-anuarios/anuarios-de-estad%C3%ADsticas-vitales/anuario-de-estad%C3%ADsticas-vitales-2022.pdf?sfvrsn=88100883_4
- Ionescu, V. A., Gheorghe, G., Bacalbasa, N., Chiotoroiu, A. L., & Diaconu, C. (2023). Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas)*, 59(9).
<https://doi.org/10.3390/medicina59091646>
- Itoh, N., Semba, S., Ito, M., Takeda, H., Kawata, S., & Yamakawa, M. (2002). Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer*, 94(12), 3127-3134.
- Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., & Berry, D. A. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*, 24(6), 1207-1222. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0201-5>
- Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(12), 713-732.
<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>
- Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2018). Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer. *Front Oncol*, 8, 160. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00160>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15065.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kuwano, Y., Tominaga, K., Kawahara, T., Sasaki, H., Takeo, K., Nishida, K., Masuda, K., Kawai, T., Teshima-Kondo, S., & Rokutan, K. (2008). Tumor necrosis factor alpha activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 45(12), 1642-1652.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.033>
- Lee, H., Lee, H. W., Kim, S. U., & Chang Kim, H. (2022). Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease Increases Colon Cancer Risk: A Nationwide Cohort Study. *Clin Transl Gastroenterol*, 13(1), e00435. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000435>
- Lee, S. R., Yang, K. S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., & Rhee, S. G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem*, 277(23), 20336-20342.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111899200>
- Li, H., Li, X. X., Ma, Q., & Cui, J. (2013). The variability of oxLDL-induced cytotoxicity on different types of cell lines. *Cell Biochem Biophys*, 67(2), 635-644.
<https://doi.org/10.1007/s12013-013-9552-5>

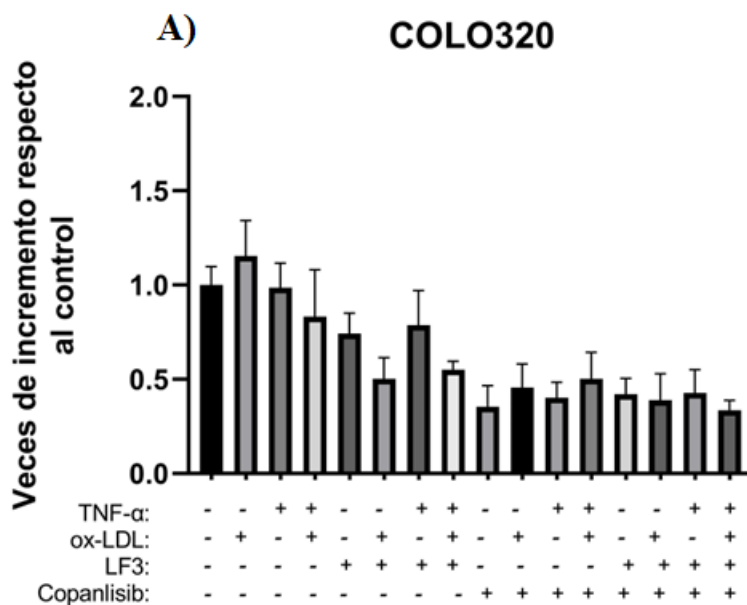
- Liu, K., Fan, J., & Wu, J. (2017). Forkhead Box Protein J1 (FOXJ1) is Overexpressed in Colorectal Cancer and Promotes Nuclear Translocation of beta-Catenin in SW620 Cells. *Med Sci Monit*, 23, 856-866. <https://doi.org/10.12659/msm.902906>
- Lu, J., Mitra, S., Wang, X., Khaidakov, M., & Mehta, J. L. (2011). Oxidative stress and lectin-like ox-LDL-receptor LOX-1 in atherogenesis and tumorigenesis. *Antioxid Redox Signal*, 15(8), 2301-2333. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3792>
- Maghzal, G. J., Krause, K. H., Stocker, R., & Jaquet, V. (2012). Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*, 53(10), 1903-1918. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.002>
- McNew, K. L., Whipple, W. J., Mehta, A. K., Grant, T. J., Ray, L., Kenny, C., & Singh, A. (2016). MEK and TAK1 Regulate Apoptosis in Colon Cancer Cells with KRAS-Dependent Activation of Proinflammatory Signaling. *Mol Cancer Res*, 14(12), 1204-1216. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0173>
- Ministerio de Salud. (2017). *Encuesta Nacional de Salud*. Retrieved from https://redsalud.ssmso.cl/wp-content/uploads/2018/02/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS-ilovepdf-compressed.pdf
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21(1), 103-115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- Ocejo, D. P. (2019). Especies reactivas de oxígeno: papel en la función vascular y en la disfunción endotelial asociada a la enfermedad metabólica Reactive oxygen species: role in vascular function and in metabolic disease-associated endothelial dysfunction. *An Real Acad Farm*, 85(4), 288-300.
- Rumińska, M., Majcher, A., Pyrzak, B., Czerwonogrodzka-Senczyzna, A., Brzewski, M., & Demkow, U. (2015). Cardiovascular risk factors in obese children and adolescents. In *Advances in Clinical Science* (pp. 39-47). Springer.
- Salud, M. d. (2019). *Guía de Práctica Cáncer Colorrectal en Personas de 15 años y más 2018*.
- Salud, M. d. (2022). *Plan Nacional de Cancer 2022-2027*. Retrieved from <https://leydelcancer.minsal.cl/documentos/Marco-general-del-Plan-Nacional-de-Cancer-2022-2027.pdf>
- Schreuders, E. H., Ruco, A., Rabeneck, L., Schoen, R. E., Sung, J. J., Young, G. P., & Kuipers, E. J. (2015). Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut*, 64(10), 1637-1649. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-309086>
- Shen, W. J., Hsieh, C. Y., Chen, C. L., Yang, K. C., Ma, C. T., Choi, P. C., & Lin, C. F. (2013). A modified fixed staining method for the simultaneous measurement of reactive oxygen species and oxidative responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 430(1), 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.037>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*, 73(1), 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*, 11, 967-976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>
- Simpson, L., & Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*, 264(1), 29-41. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5130>
- Singh, A., Sweeney, M. F., Yu, M., Burger, A., Greninger, P., Benes, C., Haber, D. A., & Settleman, J. (2012). TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers. *Cell*, 148(4), 639-650. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.033>

- Siraj, A. K., Kumar Parvathareddy, S., Pratheeshkumar, P., Padmaja Divya, S., Ahmed, S. O., Melosantos, R., Begum, R., Concepcion, R., Al-Sanea, N., Ashari, L. H., Abduljabbar, A., Al-Dayel, F., & Al-Kuraya, K. S. (2020). APC truncating mutations in Middle Eastern Population: Tankyrase inhibitor is an effective strategy to sensitize APC mutant CRC To 5-FU chemotherapy. *Biomed Pharmacother*, *121*, 109572. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109572>
- Touyz, R. M., Briones, A. M., Sedeek, M., Burger, D., & Montezano, A. C. (2011). NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Molecular interventions*, *11*(1), 27.
- Uhlen, M. (2015). *Tissue-based map of the human proteome*. Retrieved junio from
- Vera, M., Barahona, M. J., Nova-Lamperti, E., Nualart, F., & Ferrada, L. (2024). The phenol red compound: A potential artifact in pharmacological induction of ferroptosis. *Free Radic Biol Med*, *222*, 397-402. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.06.023>
- Wlodarczyk, M., & Nowicka, G. (2019). Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. *Int J Mol Sci*, *20*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051146>
- World Health Organization. (2022). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- World Health Organization. (2024). *Crece la carga mundial de cáncer en medio de una creciente necesidad de servicios*. Retrieved marzo from <https://www.who.int/es/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
- Yu, Z. B., Han, S. P., & Guo, X. R. (2010). A response to the comments by Dr Chaput on our paper 'Intelligence in relation to obesity: a systematic review and meta-analysis'. *Obes Rev*, *11*(9), 686-687. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00792.x>
- Zhang, X., Ye, X., & Jin, H. (2025). Oxidized Low-Density Lipoprotein as a Potential Target for Enhancing Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Microsatellite-Stable Colorectal Cancer. *Antioxidants*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/antiox14060726>
- Zhao, T., Li, H., & Liu, Z. (2017). Tumor necrosis factor receptor 2 promotes growth of colorectal cancer via the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett*, *13*(1), 342-346. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5403>
- Zhu, X., & Li, S. (2023). Ferroptosis, Necroptosis, and Pyroptosis in Gastrointestinal Cancers: The Chief Culprits of Tumor Progression and Drug Resistance. *Adv Sci (Weinh)*, *10*(26), e2300824. <https://doi.org/10.1002/adv.202300824>

13. ANEXOS

ANEXO 1: Inhibición de PI3K/AKT y WNT/ β -catenina reduce la viabilidad inducida por co-tratamiento en las líneas celulares COLO320 y SW620.

Con el fin de complementar la información presentada la tesis, se incluyó un anexo con un gráfico que reúne la totalidad de los controles experimentales y datos adicionales que no fueron incorporados directamente en el análisis escrito. Este material adicional permite una visualización más clara y completa de los resultados, facilitando la interpretación general del experimento y entregando un contexto más amplio para la comparación entre condiciones. Las significancias estadísticas no se asignaron para una mejor visualización.



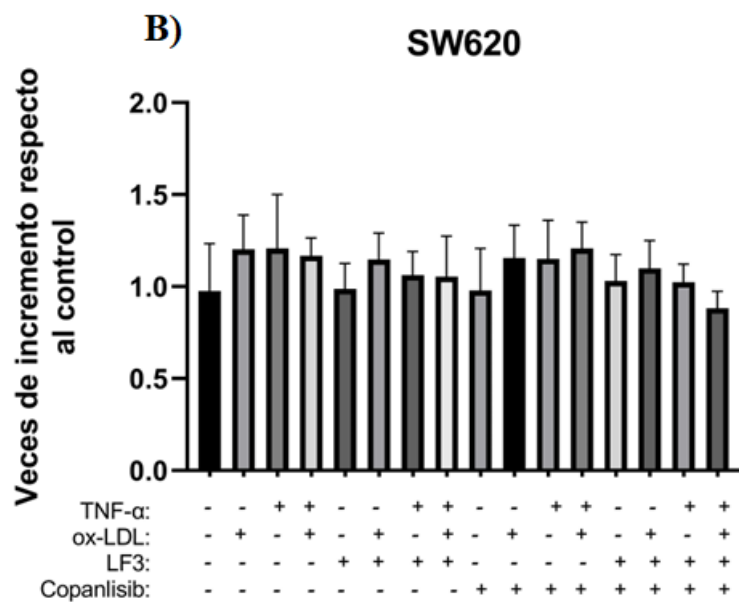


Figura 10. Efecto de inhibidores en las vías de señalización en la viabilidad celular de COLO320 y SW620.

Las células fueron tratadas con 6,25 ug/ml de ox-LDL y 15 ng/ml de TNF- α para COLO320 y 25 ug/ml de ox-LDL y 10 ng/ml de TNF- α , inhibidor Copanlisib a 30uM e inhibidor LF3 a 10 nM. Cada condición se ensayó por triplicado. Las barras representan la media \pm SD, n=2. Prueba Anova de una vía y test de comparaciones múltiples tukey. Se indican significancias con * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0.001 y **** p<0.0001