



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**EFFECTO DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD
OXIDADA EN LA RESISTENCIA A DOCETAXEL Y
CABAZITAXEL INDUCIDA POR ACTIVACIÓN DE LA VÍA
DE SEÑALIZACIÓN NF- κ B EN MODELOS CELULARES
DE CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A
CASTRACIÓN.**

POR MARIA PAZ CASTILLO CÁCERES

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímica.

Profesor Guía y patrocinante

Dr. Iván Antonio González Chavarría
Departamento de Fisiopatología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

MAYO, 2022

Concepción, Chile

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

A Nivia, Osvaldo y Matilde.

“En la Ciencia la única verdad sagrada, es que no hay verdades sagradas”

Carl Sagan.

AGRADECIMIENTOS

Luego de varios años, hartos esfuerzos y un casi fin del mundo, hemos llegado al final de esta primera maratón académica. Pienso en todo el camino recorrido y en todas las personas que me han acompañado, y creo que este pequeño espacio se me hará insuficiente para agradecerles a todos.

Infinitas gracias a las personas que me han visto crecer, que han apoyado cada una de mis decisiones, quienes me permitieron volar en este maravilloso y caótico mundo de la ciencia, y quienes me han entregado su amor incondicional durante 26 años, sobre todo durante este tiempo en el que muchas veces creí que no podría lograrlo. A ellos, mis padres Nivia y Osvaldo, quienes a punta de esfuerzo y amor me permitieron llegar a donde estoy hoy. A ellos, que cuando me sentía caer, estuvieron allí para sostenerme. Gracias por permitirme poder entregarles esta pequeña alegría de llegar a la meta, y por acompañarme siempre.

Gracias a mi familia elegida en este lugar, al que llegué sin saber si quiera el nombre de una calle. Gracias por hacer mis días universitarios más llevaderos y llenos de risas. Gracias a mis amigos Matías, Martín y Nicolás, y a todos quienes estuvieron presentes de alguna u otra forma en miles de situaciones, por todos los buenos momentos y por el apañe en los no tan buenos. Gracias a mi amiga Rocío y a mis bebés Maximiliano y Trinidad, quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron para apoyarme, creer en mí y alegrarme el día cuando pintaba para gris.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Félix, quién con mucha, mucha paciencia, estuvo para ayudarme en cada duda que tuve, para enseñarme, aconsejarme y para reírnos de nuestras desgracias científicas con los chicos del equipo (todos deberían tener un compañero de laboratorio como Félix). Gracias a Yerko, Marcela, los más pequeños de nuestro grupo. Gracias por el apañe científico y por todas las risas, sobre todo cuando nuestros western blot eran un desastre, o se nos contaminaban las células (y teníamos que reírnos para no llorar). Estoy segura de que serán científicos/as brillantes, porque lo están demostrado con creces. Nunca dejen de creer en sus capacidades.

Gracias al Dr. Iván, por recibirme de forma muy amena en su grupo de investigación, por permitir desarrollarme como científica, por su gran apoyo y también por creer en mí. Gracias por su gran calidad humana y profesional y también por aceptarme (por cuatro años más) como su alumna en el doctorado.

Sin duda, todos fueron esenciales en este camino llamado ciencia, y estaré eternamente agradecida por ello.

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

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	III
TABLA DE CONTENIDOS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
a. Generalidades sobre el cáncer de próstata.	1
b. Tratamiento del cáncer de próstata.....	6
c. Cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) y su tratamiento.....	7
d. Mecanismos moleculares asociados a la resistencia a Docetaxel en CRPC	8
e. CPRC resistente a Docetaxel y tratamiento con Cabazitaxel.	10
f. Mecanismos moleculares asociados a la resistencia a Cabazitaxel.	11
g. Lipoproteína de baja densidad, procesos de oxidación y generación de oxLDL:	13
h. Lipoproteína de baja densidad oxidada en contexto patológico: aterosclerosis y cáncer.	14
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVOS	22
a. Objetivo General:	22

b. Objetivos específicos	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
a. Objetivo específico 1: Determinar la función de oxLDL en la activación de la vía de señalización NF-κB en modelos celulares de CPRC	23
- Generación de cultivos celulares de líneas celulares C4-2B, 22RV1 y DU145.	23
- Tratamiento de cultivos celulares DU145, C4-2B y 22RV1 con oxLDL:24	
- Extracción y cuantificación de proteínas asociadas a la activación de la vía de señalización la vía NF-κB:	25
- Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot:	26
b. Objetivo específico 2: Determinar la función de oxLDL en la expresión de marcadores relacionados a la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel en CPRC.	27
- Generación y tratamiento de cultivos celulares C4-2B, 22RV1 y DU145 con oxLDL para extracción de proteínas.	28
- Extracción y cuantificación de Proteínas para análisis de marcadores asociados a resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a castración.	28
- Análisis por Western Blot de MDR1 y TUBB3 como marcadores de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel:	29
- Análisis de la expresión de MDR1 como marcador de resistencia a drogas en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración mediante inmunocitoquímica.	29
c. Objetivo específico 3: Analizar el papel de oxLDL y el aumento en la sobrevivencia celular y resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel en líneas celulares de CRPC.	31
- Tratamiento de cultivos celulares C4-2B, 22RV1 y DU145 para ensayos de supervivencia celular y citotoxicidad:	31
- Ensayos de citotoxicidad para determinar el porcentaje de supervivencia celular de 22RV1, DU145 y C4-2B a Docetaxel y Cabazitaxel: 31	
d. Análisis de expresión de receptores scavenger para oxLDL en bases de datos públicas.....	33

e. Análisis de datos e imágenes:	33
3. RESULTADOS.....	36
a. La oxLDL incrementa los niveles p-p65- NF-κB en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración 22RV1, C4-2B y DU145.....	36
b. La oxLDL activa la vía de señalización p52- NF-κB en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración DU145 y C4-2B.	38
c. La oxLDL induce la expresión del marcador de resistencia MDR1 en las líneas celulares de CRPC 22RV1, DU145 y C4-2B.....	40
d. La oxLDL induce la expresión del marcador de resistencia TUBB3 en las líneas celulares de CRPC 22RV1, DU145 y C4-2B.....	42
e. MDR1 es expresada en la membrana celular cuando las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B son tratadas con oxLDL.....	44
f. La sobrevivencia celular de 22RV1, DU145 y C4-2B frente al tratamiento con Docetaxel y Cabazitaxel aumenta cuando las líneas celulares son tratadas previamente con oxLDL.....	47
g. Los receptores scavenger para oxLDL se encuentran aumentados en tumores primarios de próstata y metástasis en comparación con el tejido prostático normal.	50
5. DISCUSIÓN	52
6. CONCLUSIÓN	76
7. REFERENCIAS.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación TNM utilizada para la estadificación del cáncer de próstata-----	pag 5
Tabla 2: Clasificación de Gleason utilizada para la estadificación del cáncer de próstata en base a biopsias prostáticas y su respectivo patrón histológico-----	pag 5
Tabla 3: Anticuerpos primarios utilizados en identificación de marcadores de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel y activación de p65-NF-kB y p52-NF-kB---	pag 34
Tabla 4: Anticuerpos secundarios utilizados en identificación de marcadores de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel y activación de p65-NF-kB y p52-NF-kB---	pag 34
Tabla 5: Anticuerpos primarios utilizados en inmunocitoquímica para MDR1-----	pag 34
Tabla 6: Anticuerpo secundario utilizado en inmunocitoquímica para MDR1-----	pag 35
Tabla 7: Concentraciones de Docetaxel y Cabazitaxel utilizadas en ensayos de citotoxicidad en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B-----	pag 35

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

- Figura 1:** Cuantificación relativa de la expresión de p-p65 contra control sin tratamiento de oxLDL 50µg/mL por 24 horas en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B.-----pag 37
- Figura 2:** Cuantificación relativa de la expresión de p52 contra control sin tratamiento de oxLDL 50µg/mL por 24 horas en la líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B-----pag 39
- Figura 3:** Cuantificación relativa de la expresión de MDR1 contra control sin tratamiento de oxLDL 50µg/mL por 24 horas en la líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B-----pag 41
- Figura 4:** Cuantificación relativa de la expresión de β -III TUB contra control sin tratamiento de oxLDL 50µg/mL por 24 horas en la líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B-----pag 43
- Figura 5:** Colocalización de MDR1 en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B-----pag 45
- Figura 6:** Ensayos de citotoxicidad frente a Docetaxel y Cabazitaxel en líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B tratadas con oxLDL. -----pag 48

Figura 7: Niveles de expresión de receptores scavenger para oxLDL en distintos estadios del cáncer de próstata-----pag 51

RESUMEN

El cáncer de próstata avanzado es tratado preferentemente con deprivación de andrógenos (ADT), sin embargo, un gran grupo de pacientes desarrollarán resistencia al tratamiento. El cáncer de próstata resistente a ADT o también conocido como resistente a castración (CPRC) es tratado con Docetaxel, sin embargo, un porcentaje importante de pacientes generará también resistencia a este tratamiento, generando un cáncer de próstata resistente a la castración resistente a Docetaxel.

El tratamiento para este tipo de cáncer es el fármaco Cabazitaxel, sin embargo, la efectividad a este medicamento se verá limitada en poco tiempo por la aparición de resistencia en un gran número de pacientes. La vía NF- κ B está relacionada con la resistencia a Docetaxel, y se cree que también está relacionada con la resistencia a Cabazitaxel, promoviendo la expresión de ABCB1 y TUBB3. Interesantemente, la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) está aumentada en el plasma de pacientes con CRPC y en otras patologías se ha visto que promueve la activación NF- κ B, sin embargo, su función en la generación de resistencia a drogas no ha sido descrita.

Hipotetizamos que la activación de las vías de señalización NF- κ B p52-p65, por la acción de oxLDL, inducen la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel mediante la

sobreexpresión de marcadores de resistencia a la terapia, como MDR1 y TUBB3 en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración.

Analizamos el efecto de oxLDL sobre la activación de NF- κ B p65 y p52 en modelos celulares de CRPC, en la expresión de marcadores de resistencia a taxanos como TUBB3 y MDR1 y su efecto en la supervivencia celular a estas drogas.

Los resultados mostraron un aumento en la expresión de NF- κ B p65 y p52, un aumento en la expresión de TUBB3 y MDR1, como también un aumento en la supervivencia celular para las líneas tratadas con oxLDL y con los taxanos Docetaxel o Cabazitaxel. También, observamos la sobreexpresión de receptores scavenger para oxLDL en distintos estadios de la enfermedad y que pueden estar contribuyendo a los efectos observados por interacción con oxLDL.

Podemos concluir en base a los resultados obtenidos, que la activación NF- κ B p52-p65, por acción de oxLDL, inducen la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel mediante la sobreexpresión de MDR1 y TUBB3 en los modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración estudiados.

ABSTRACT

Advanced prostate cancer is preferentially treated with androgen deprivation (ADT), however, patients will develop resistance to the treatment. ADT-resistant or also known as castration-resistant prostate cancer (CRPC) is treated with Docetaxel, however, a significant percentage of patients will also develop resistance to this treatment, resulting in Docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer.

The treatment for this type of cancer is the drug Cabazitaxel, however, the effectiveness of this drug will be limited in a short time due to the appearance of resistance in a large number of patients. The NF- κ B pathway is related to resistance to Docetaxel, and is also believed to be related to resistance to Cabazitaxel, promoting the expression of ABCB1 and TUBB3. Interestingly, oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) is increased in the plasma of patients with CRPC and in other pathologies has been seen to promote NF- κ B activation, however, its role in the generation of drug resistance has not been described.

We hypothesized that activation of NF- κ B p52-p65 signaling pathways, by the action of oxLDL, induce resistance to Docetaxel and Cabazitaxel through overexpression of MDR1 and TUBB3 in castration-resistant prostate cancer cell models.

We analyzed the effect of oxLDL on NF- κ B p65 and p52 activation in CRPC cell models, on the expression of taxane resistance markers such as TUBB3 and MDR1 and their effect on cell survival to these drugs.

The results showed increased expression of NF- κ B p65 and p52, increased expression of TUBB3 and MDR1, as well as increased cell survival for lines treated with oxLDL, Docetaxel and Cabazitaxel. We also observed overexpression of scavenger receptors for oxLDL at different stages of the disease, which may be contributing to the effects observed by interaction with oxLDL.

We can conclude based on the results obtained, that NF- κ B p52-p65 activation, by action of oxLDL, induce resistance to Docetaxel and Cabazitaxel through overexpression of MDR1 and TUBB3 in the castration-resistant prostate cancer cell models studied.

1. INTRODUCCIÓN

a. Generalidades sobre el cáncer de próstata.

El cáncer, como enfermedad no transmisible es actualmente el causante de la mayoría de las muertes en hombres y mujeres a nivel mundial. También se posiciona como la principal barrera en el aumento de la esperanza de vida en todo el mundo durante este siglo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer se encuentra entre la primera y segunda causa de muerte en individuos de hasta 70 años en la mayor parte de los países del mundo (Bray et al., 2018)

El cáncer de próstata (CaP), es una de las neoplasias malignas más comúnmente diagnosticada en hombres de 50 años o más, siendo una patología de lenta progresión, pero de alta incidencia en la población masculina (Ministerio de Salud de Chile., 2015). Anualmente se diagnostican aproximadamente a 1,6 millones de individuos con esta enfermedad y cerca de 366.000 hombres morirán a causa de esta patología en el mismo periodo de tiempo (Pernar et al., 2018). En las últimas décadas, en Latinoamérica el aumento en la esperanza de vida ha crecido considerablemente, trayendo consigo el envejecimiento de la población, lo que

implica, inevitablemente, una mayor incidencia del cáncer, y esto incluye al cáncer de próstata. Pese a que se cuenta con muchas mejorías en el ámbito de la salud y el cuidado de la población, las tasas de mortalidad por cáncer de próstata en esta región del mundo son el doble que la de los países desarrollados (Reis et al., 2020). En la actualidad en Chile, se observa un panorama similar en cuanto a la incidencia y mortalidad del CaP con respecto a los demás países de la región. De acuerdo con estadísticas recientes, al año 2020 en el país se diagnosticaron a 8157 pacientes y fallecieron 2296 hombres por esta causa, posicionando al cáncer de próstata como la primera incidencia de cáncer y la tercera causa de muerte por cáncer en la población masculina chilena (Sung et al., 2021).

Dentro de los principales factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de próstata, se encuentran la raza, la edad, el componente genético, la historia familiar y el síndrome metabólico y la obesidad. En cuanto a este último, a pesar de que se ha asociado una alta comorbilidad junto al cáncer de próstata, solamente los factores de riesgo de etnia, edad y antecedentes familiares han sido bien caracterizados (Hsing et al., 2007). Con el paso del tiempo, y gracias a numerosos estudios, se ha demostrado que diversos tipos de cáncer, entre ellos el CaP, están relacionados con el síndrome metabólico, que se define como el cumplimiento de al menos una de las siguientes condiciones: hipercolesterolemia, dislipidemias, disminución del colesterol de alta densidad, aumento del colesterol de baja densidad, hipertensión, o glucosa sérica elevada

en ayunas (Rice et al., 2012) lo que sugiere que el cáncer de próstata también considera al factor dietético como determinante para su progresión y desarrollo (Kaiser et al., 2019). Dentro de los parámetros del síndrome metabólico que se han relacionado fuertemente con el cáncer de próstata, se encuentra la obesidad. Esta se define como la acumulación de un exceso de grasa corporal que perjudica la salud, producto del desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético (Adesunloye, 2021). En términos de unidades del índice de masa corporal (IMC) que se expresa como la relación entre el peso corporal en kilogramos y la altura en metros cuadrados, la obesidad se define como un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Piché et al., 2020). Para los hombres que padecen CaP, la obesidad se ha asociado con un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad luego de un tratamiento con intenciones curativas, también con un rápido paso a un cáncer de mayor grado y malignidad, y un aumento en la mortalidad producto de la enfermedad. La obesidad en estos pacientes se ha asociado también con el aumento de efectos adversos secundarios agudos más graves y a largo plazo. Los pacientes con cáncer que además padecen obesidad presentan un tiempo mucho menor para desarrollar cáncer de próstata resistente a la castración en comparación con individuos no obesos (Wilson et al., 2022). Se ha observado también, que los pacientes obesos o con sobrepeso, aparte de padecer los problemas que se han mencionado anteriormente, también presentan fenómenos de resistencia a las terapias empleadas para tratar el cáncer de próstata (Adesunloye, 2021b).

Los algoritmos de tratamiento para el cáncer de próstata dependen del estadio clínico patológico de la enfermedad. El comité conjunto sobre el cáncer de Estados Unidos (AJCC) y la Unión internacional para el control del cáncer (UICC) han utilizado el sistema de clasificación TNM que permite clasificar según estándares comunes diferentes tipos de cánceres. En este sentido, el CaP se puede clasificar dependiendo del tamaño, localización e invasión y metástasis del tumor (Rosen & Sapra, 2022). Con el sistema de clasificación TNM, se evalúa tanto el tumor original (T), si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N) o si ha hecho metástasis a distintas partes del cuerpo (M) (Tabla 1).

Otra escala utilizada para la estadificación del cáncer de próstata es la escala de Gleason (tabla 2). Este tipo de clasificación se basa en la observación histopatológica del grado de diferenciación de las células tumorales, asignándoles puntajes en una escala de 1 a 10 a los dos campos más representativos de la muestra, obteniéndose un máximo de diez puntos para el cáncer más agresivo. Así, puede asignarse un alto puntaje de Gleason a los tumores en que se presenta un mayor grado de anaplasia, clasificándose como un cáncer de mayor agresividad y menor pronóstico de sobrevida que un cáncer con un puntaje Gleason menor (Humphrey, 2004).

Tabla 1: Clasificación TNM utilizada para la estadificación del cáncer de próstata.

Tumor primario (T)	
Tx	No se puede evaluar el tumor
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1	Tumor clínicamente inaparente, no palpable y no visible por imágenes
T2	Órgano confinado
T3	El tumor se extiende más allá de la glándula prostática
T4	El tumor invade el esfínter externo, el recto y la pared lateral pélvica.
Ganglios linfáticos (N)	
Nx	No se evaluaron los ganglios regionales
N0	No hay ganglios regionales
N1	Metástasis en ganglios regionales: pélvica, hipogástrica, obturatriz, ilíaca, sacra
Metástasis (M)	
Mx	Ganglios regionales no evaluados
M0	Sin metástasis
M1	Presencia de metástasis distante

Tabla 2: Clasificación de Gleason utilizada para la estadificación del cáncer de próstata en base a biopsias prostáticas y su respectivo patrón histológico.

Grupo	Puntaje de Gleason	Definición del patrón histológico
1	< 6	Solamente glándulas discretas y bien formadas
2	3+4=7	Glándulas predominantemente bien formadas con un componente menor de glándulas mal formadas, fusionadas, cribiformes, glomeruloides.
3	4+3=7	Glándulas predominantemente mal formadas, fusionadas, cribiformes y glomeruloides, con un componente menor de glándulas bien formadas.
4	8	Solamente glándulas mal formadas, fusionadas, cribiformes o glomeruloides. Glándulas predominantemente bien formadas con componente menor sin glándulas. Patrón predominantemente sin glándulas con un componente menor de glándulas bien formadas.
5	9-10	Ausencia de formación glandular (o presencia de necrosis) con o sin glándulas mal formadas, fusionadas, cribiformes.

b. Tratamiento del cáncer de próstata.

Cuando un paciente posee CaP localizado (T1 o T2), el tratamiento se basa principalmente en una prostatectomía junto a radioterapia, la que será efectiva en un gran porcentaje de pacientes. Sin embargo, parte de ellos desarrolla recidiva, incluso con el desarrollo de tumores con mayor grado malignidad (T3 o T4). Así, los pacientes que son diagnosticados con estadios T3 o T4 o los que desarrollaron una progresión hacia estos estadios son tratados principalmente con hormonoterapia, esto debido a que este tipo de CaP avanzado es dependiente de los andrógenos testiculares y suprarrenales para su proliferación y supervivencia. Mediante las terapias de supresión de andrógenos, principalmente con agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) se genera una disminución significativa del 85% de los andrógenos de origen testicular (Ministerio de Salud de Chile., 2015). Este tratamiento es efectivo en un 40% de pacientes, sin embargo, el grupo restante no responderá a esta terapia, desarrollando un cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) el cual se caracteriza por una progresión del cáncer en concentraciones de andrógenos en niveles de castración (J. Kroon et al., 2016), <50 ng/dL de testosterona circulante (Shore et al., 2021). De igual manera, un amplio porcentaje de los pacientes con CaP sensible a andrógenos desarrollará resistencia a la supresión de andrógenos en los años posteriores de iniciado el tratamiento.

c. Cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) y su tratamiento.

Las estrategias terapéuticas para los pacientes con CRPC son preferentemente la terapia basada en taxanos como Docetaxel, Cabazitaxel, antagonistas del receptor de andrógenos como Enzalutamida y Flutamida y los antagonistas del citocromo p450 isoforma 17 A (CYP17A1), una enzima determinante en la generación de andrógenos intratumorales, la Abiraterona (Schweizer & Antonarakis, 2014). En particular, los taxanos son moléculas quimioterapéuticas que ejercen su mecanismo de acción antitumoral, mediante la unión a β -tubulina de los microtúbulos, la cual tiene una función clave en la mitosis y transporte intracelular (Ojima et al., 2016). Estos microtúbulos son polímeros altamente dinámicos compuestos por monómeros de tubulina α y β , las cuales continuamente se encuentran en dinámicas de ensamblaje y desensamblaje en el espacio intracelular. Los taxanos inhiben la función de los microtúbulos al unirse directamente a las moléculas de tubulina, promoviendo su polimerización y la estabilización. El bloqueo de la dinámica de los microtúbulos conduce a un bloqueo de la mitosis en la fase G2/M para finalmente conducir a la muerte de las células tumorales mediante apoptosis (Vrignaud et al., 2014).

Dentro de esta familia de fármacos destacan tres quimioterapéuticos, que se han usado ampliamente en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a castración: Paclitaxel, Docetaxel y Cabazitaxel, siendo estos últimos derivados semisintéticos del primero. En la actualidad, y de acuerdo con las guías clínicas

disponibles en el Ministerio de Salud, el fármaco de elección en pacientes con CRPC es Docetaxel, principalmente en pacientes clasificados como “con buen estado general de salud” (Ministerio de Salud de Chile., 2015).

Docetaxel es un fármaco antineoplásico antimitótico, cuya función es la estabilización, mediante la unión de las unidades de β -tubulina en los microtúbulos, evitando la despolimerización que se requiere para el proceso de mitosis, lo que finalmente se traduce en apoptosis celular (Chandrasekar et al., 2015a) y es activo en otros blancos terapéuticos, específicamente sobre la fosforilación de Bcl-2 impidiendo su hetero dimerización, induciendo activación de caspasas y promoviendo el proceso apoptótico (Fabbri et al., 2008; Magadoux et al., 2014). Pese a que este tratamiento suele ser efectivo en primera instancia, todos los pacientes que reciban esta terapia eventualmente desarrollarán también resistencia a este agente quimioterapéutico, progresando a un CRPC resistente a Docetaxel (Chandrasekar et al., 2015b).

d. Mecanismos moleculares asociados a la resistencia a Docetaxel en CRPC

Entre los mecanismos de resistencia a Docetaxel en CRPC, se han descrito principalmente los asociados a la sobreexpresión de proteínas de resistencia a múltiples drogas (MDR) como la glicoproteína P o MRP1 o ABCB1, que actúan como bombas de salida de los fármacos en las células (Magadoux et al., 2014). En otros tipos de cáncer, se ha observado que la sobreexpresión de ABCB1 está

regulada al alza y esto sería crucial para la resistencia a diversos agentes quimioterapéuticos (G. Wang et al., 2018). También se han observado diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que están relacionados con la sobreexpresión y la afinidad de ABCB1 por su sustrato (Sissung et al., 2008). Se han descrito también mecanismos asociados a isoformas de β -tubulina, como TUBB3, la cual no posee el dominio de unión a Docetaxel, impidiendo que el fármaco cumpla su función antimetabólica, generando así resistencia al tratamiento (Terry et al., 2009)

Otros mecanismos asociados al fracaso terapéutico en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a castración con Docetaxel, se relacionan con vías de supervivencia celular que son activadas por mecanismos de estrés generados por la unión β -tubulina en respuesta a la detención de la dinámica celular. En este contexto, se ha observado la activación de diferentes vías de señalización como JNK, JAK, activación de factores de transcripción como STAT1 y STAT3, entre otros. Por ejemplo, STAT3 está implicado en la resistencia a Docetaxel a través de serina-treonina quinasa PIM1, que ha demostrado mejorar la supervivencia de líneas celulares de CRPC (Magadoux et al., 2014). Aparte de los mecanismos antes mencionados existe también expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8, y otras vías de supervivencia celular como NF- κ B (Patterson et al., 2006). Con respecto a esta última, se ha demostrado que Docetaxel es capaz de activar NF- κ B, que una activación constitutiva de la vía por la estimulación de I κ B quinasa (IKK) interfiere en la actividad citotóxica de

Docetaxel en algunas líneas celulares de cáncer de próstata como DU145 y PC-3 (Gan et al., 2011), lo que genera resistencia a la terapia. Muchos de estos factores se relacionan en vías de señalización comunes, lo que hace que la resistencia a los tratamientos en esta patología sea un escenario complejo.

e. CRPC resistente a Docetaxel y tratamiento con Cabazitaxel.

Cuando la enfermedad progresa a pesar de haber recibido tratamiento previo con Docetaxel, se genera lo que se conoce como CRPC resistente a Docetaxel. La alternativa terapéutica utilizada según lo estipulado en guías clínicas disponibles es el fármaco Cabazitaxel (CBZ) y se emplea en pacientes con buen estado general de salud tanto sintomáticos, levemente sintomáticos y asintomáticos tratados previamente con Docetaxel u otros fármacos como Abiraterona y Enzalutamida (Ministerio de Salud de Chile., 2015). Cabazitaxel es un taxano de tercera generación que, al igual que Docetaxel, interfiere en la dinámica de los microtúbulos, estabilizándolos e impidiendo su despolimerización, bloqueando la división celular en fase G2 lo que se traduce en la muerte celular por apoptosis (Duran et al., 2015). Cabazitaxel fue aprobado por la FDA el año 2010 para el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración resistente a Docetaxel (Hongo et al., 2018). Su uso en combinación con Prednisona ha demostrado clínicamente beneficios en pacientes con CRPC resistente a Docetaxel aumentando su supervivencia global en 15.1 meses en comparación con otros fármacos (Ministerio de Salud de Chile., 2015); sin embargo, la duración de

la respuesta del cáncer a CBZ está limitada solo a algunos meses luego de iniciada la terapia con el fármaco, y no hay tratamientos efectivos para CRPC resistentes a CBZ (Hongo et al., 2018).

f. Mecanismos moleculares asociados a la resistencia a Cabazitaxel.

Actualmente, los mecanismos de resistencia de CBZ son menos conocidos. Se ha visto que influyen en la resistencia al fármaco la pérdida de la proteína del retinoblastoma, que es una proteína supresora tumoral cuya función es la de promover la transición G0-G1 cuando se fosforila por CDK3/ciclina C, y actuar como represor transcripcional de genes objetivos de E2F1 (de Leeuw et al., 2015). La pérdida del transportador de membrana SLCO1B3 (transportador de aniones orgánicos portadores de solutos 1B3) que es un transportador conocido de Docetaxel, es otro mecanismo de resistencia asociado a este fármaco. Además, se ha observado que, producto de la resistencia cruzada entre ambos fármacos, la pérdida de SLCO1B3 generaría también resistencia a Cabazitaxel (de Morrée et al., 2016). Se ha observado que líneas celulares de CRPC que son resistentes a Docetaxel, son también resistentes a Cabazitaxel, y esto está directamente relacionado con la regulación al alza de la proteína MDR1 (Lombard et al., 2017).

En otros estudios, se ha determinado que no solo los mecanismos mencionados anteriormente están relacionados con la resistencia a Cabazitaxel en CRPC, sino que también mecanismos que se han observado en la resistencia a Docetaxel,

están también relacionados con la resistencia a CBZ como por ejemplo los elevados niveles de β -tubulina III que se observó en diversos modelos celulares de cáncer de próstata. Todos estos datos hacen pensar que los mecanismos que confieren resistencia a Docetaxel tales como la expresión de ABCB1, TUBB3, vías de supervivencia celular y otros, están también relacionados con la resistencia cruzada a Cabazitaxel (Lombard et al., 2017). Mediante estudios de microarrays en líneas celulares de CRPC, se han observado mejoras en los grupos de genes asociados a división celular y división nuclear mitótica en líneas celulares resistente a CBZ. También se ha observado la inhibición del arresto celular en G2/M producido por el fármaco, lo que sería explicado por la mejora en la señalización de progresión del ciclo celular, y con ello se generaría un aumento de la resistencia al tratamiento por una disminución de la muerte celular (Hongo et al., 2018).

Investigadores han demostraron en modelos celulares de cáncer pancreático (CP) que el fármaco CBZ es capaz de activar e inducir la translocación al núcleo de NF- κ B-p65 luego del tratamiento con CBZ. En líneas celulares resistentes a fármacos que sobre expresaban NF- κ B-p65 se realizaron ensayos de supervivencia celular donde se observó, que las células que expresaban NF- κ B-p65 disminuyeron la sensibilidad al tratamiento con CBZ, sugiriendo que la activación de la vía NF- κ B puede involucrarse en la resistencia de las células a CBZ (Li et al., 2020).

g. Lipoproteína de baja densidad, procesos de oxidación y generación de oxLDL:

Resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la lipoproteína de baja densidad oxidada promueve en parte la resistencia a enzalutamida mediante la generación de ROS y posterior activación de la vía NF- κ B (Duprat et al., 2021), sin embargo, no hay información sobre los efectos que esta podría generar en la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel. La lipoproteína de baja densidad se define como un conjunto de lipoproteínas que pueden ser aisladas mediante ultra centrifugación en gradiente de densidad con un rango de densidades de entre 1,019 a 1,063 g/mL (Mahley et al., 1984). Son moléculas esféricas con un diámetro de entre 20-23 nm y su peso molecular está entre los 1,8 y 2,8 x10⁶ Da. Están constituidas por una parte lipídica y una parte proteica. Los lípidos centrales de las LDL están compuestos por ésteres de colesterol, triglicéridos, una monocapa externa de colesterol libre y fosfolípidos, entre ellos, la fosfatidilcolina, y la parte proteica es una molécula de apoproteína, específicamente la Apo-B100 (Yoshida & Kisugi, 2010). Estas lipoproteínas son susceptibles de oxidación por diversos procesos fisiopatológicos constituyendo lo que se conoce como las lipoproteínas de baja densidad oxidadas. El proceso de oxidación de las LDL se centra en dos etapas principales, donde en una primera instancia solo ocurren cambios a nivel de los lípidos de la LDL, y no en la estructura proteica. En este proceso, se genera la lipoproteína de baja

densidad mínimamente oxidada. Al adquirir una pequeña carga negativa, esta molécula es capaz de activar señales anti apoptóticas e inducir procesos inflamatorios que traen consigo aumento de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (Bitorina et al., 2019), lo que genera que las partículas de LDL sigan oxidándose, dando origen a lipoproteínas de baja densidad oxidada, todo esto en un contexto patológico como es la aterosclerosis. En esta instancia la molécula ya ha sufrido cambios en su componente proteico y cuando esto sucede, el receptor de LDL ya no reconoce a la LDL oxidada, pero estas son reconocidas por diversos tipos de receptores scavenger como CD36, LOX-1, SRA1 y SR-B1. Los lípidos de la LDL oxidada son altamente citotóxicos y pro apoptóticos (Yoshida & Kisugi, 2010) y durante el proceso de oxidación, se producen cambios oxidativos no enzimáticos en los aminoácidos como también la proteólisis y se producen enlaces cruzados entre la apoproteína B (ApoB) dando como resultado una alteración extensa en la composición y estructura proteica. Por otra parte, los lípidos peroxidados se descomponen generando aldehídos y cetonas libres que modifican covalentemente los residuos ϵ -amino de lisina de la parte proteica de la LDL (Parthasarathy et al., 2010), lo que genera diversos efectos en el tejido circundante y en el organismo en general.

h. Lipoproteína de baja densidad oxidada en contexto patológico: aterosclerosis y cáncer.

En el contexto patológico, oxLDL participa activamente en la formación y progresión de la placa aterosclerótica. Es capaz de interaccionar con diversos

receptores de tipo scavenger (SR) como, por ejemplo, SR-A, SR-B1, CD36 y LOX-1 (Pirillo et al., 2013), en diversos tipos celulares. Mediante esta interacción, las partículas de oxLDL aumentan la expresión de moléculas de adhesión tales como VCAM-1, P-selectina, E-selectina, ICAM-1 (da Luz et al., 2018), lo que conduce al reclutamiento de leucocitos, principalmente monocitos y linfocitos T hacia el subespacio endotelial. Luego, con la generación de quimioquinas como la proteína quimioatrayente de monocitos MCP-1, interferón (INF)- γ , estas células migrarán hasta la íntima arterial (Kattoor et al., 2017) desde donde se producen una serie de eventos celulares como la migración y transformación de monocitos en macrófagos, lo que regula al alza diversos receptores, entre ellos los SR que finalmente son capaces de internalizar oxLDL, generando la acumulación de lípidos y finalmente la formación de células espumosas (Pirillo et al., 2013). En el contexto inflamatorio y de la formación de la placa aterosclerótica, oxLDL es capaz de activar mediante interacción con diversos receptores, algunas vías de señalización. Por ejemplo, la activación de la vía JAK-STAT, una importante vía en el inicio y progresión de la aterosclerosis es activada por oxLDL. Se ha observado en modelos murinos de aterosclerosis, que los niveles de IL-6 y TNF- α aumentaron considerablemente en plasma y tejido aórtico cuando aumenta la forma fosforilada de STAT3 (p-STAT3), y también se observó que al ocurrir la activación de STAT4 por acción de IL-12, ocurre la diferenciación de células T en Th1, típicas en el proceso de aterosclerosis, que a su vez secretan grandes cantidades de INF- γ y TNF- α , esto genera la activación

de macrófagos y promoviendo el desarrollo de la placa aterosclerótica. (Zhu et al., 2018).

Por otra parte, se ha observado la activación de la vía de señalización NF- κ B mediante receptores de tipo TOLL, específicamente TLR4, lo que conducen a la producción de citoquinas proinflamatorias, y como resultado se regula al alza la expresión de genes como por ejemplo ABCG1, que es crucial en la respuesta inflamatoria y la acumulación de lípidos en el tejido aórtico, proceso que está relacionado con la progresión y vulnerabilidad de la placa (Yvan-Charvet et al., 2008).

Como se mencionó en los párrafos anteriores, una de las vías de señalización que tiene un papel esencial en los procesos inflamatorios es la vía de señalización NF- κ B, la que es activada por la interacción de oxLDL con receptores scavenger. Estos receptores se encuentran principalmente en las células endoteliales y órganos ricos en vasculatura, especialmente en los componentes celulares de las lesiones ateroscleróticas, tanto al inicio como en etapas tardías del proceso (Balzan & Lubrano, 2018a). La unión de oxLDL a estos receptores aumenta la producción intracelular de ROS, lo que estimula la activación de NF- κ B, y esto a su vez contribuye al alza en la producción de moléculas de adhesión, citoquinas proinflamatorias, factores tisulares y proteínas de remodelación tales como las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9 (Murdocca et al., 2021). Se ha observado también, que oxLDL y receptores

scavenger como LOX-1 se encuentran sobre expresados en CRPC, lo que sugiere un papel activo de oxLDL y su receptor en la progresión de la enfermedad hasta estadios avanzados (González-Chavarría et al., 2018). También, se ha demostrado que oxLDL aumenta la proliferación y migración celular mediante la activación de genes diana de la vía de señalización NF- κ B tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9, como también se demostró el rol activador de la angiogénesis tumoral, la transición epitelio-mesenquimal de las células cancerosas y el crecimiento tumoral y metástasis de las células de cáncer de próstata (González-Chavarría et al., 2014).

Por otra parte, la evidencia reciente ha demostrado que la forma en la que se relacionan a la obesidad con el riesgo aumentado de padecer cáncer es mediante el metabolismo lipídico alterado (Bitorina et al., 2021). Diversos estudios en modelos animales, así como los datos epidemiológicos en pacientes que padecen cáncer, han demostrado que las enfermedades del metabolismo lipídico aumentan considerablemente el riesgo de padecer algunos tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama, colon, hígado y próstata (Bitorina et al., 2019). Se ha informado también, que los niveles plasmáticos de oxLDL, triglicéridos, colesterol total, están aumentados en pacientes que padecen cáncer de mama (Laisupasin et al., 2020) y cáncer de colon en estadios tempranos (Diakowska et al., 2015) y también en pacientes con cáncer de próstata avanzado (Wong et al., 2003).

En este contexto, se ha visto que oxLDL es capaz de activar la vía de señalización NF- κ B, y esta se relaciona de forma importante en el desarrollo, pronóstico del cáncer, la progresión de este a CPRC como también la resistencia a la terapia, la proliferación y supervivencia celular, y particularmente, p52, RelA, RelB, y c-Rel son subunidades de NF- κ B que se han visto involucradas en el cáncer de próstata (Bitorina et al., 2019). En base a todos los antecedentes mencionados anteriormente, los niveles séricos de oxLDL se han utilizado como biomarcador de procesos de estrés oxidativo en procesos fisiopatológicos como la aterosclerosis, la disfunción endotelial, pero también se le ha relacionado directamente con la tumorigénesis (Bitorina et al., 2019). Estas moléculas de oxLDL generan un ambiente propicio para la ocurrencia de diversos fenómenos que contribuyen al desarrollo y progresión de diversos tipos de tumores, cambios fenotípicos y genotípicos desde células normales a células cancerosas, ya sea a través de cambios en el ambiente hormonal como también a través de modificaciones en las membranas celulares, mediante la modulación de la respuesta inmune hacia la células tumorales, y a través del estrés oxidativo en la generación de la oxidación de lipoproteínas circulantes (Bitorina et al., 2019).

Específicamente en el cáncer de próstata, estudios realizados a pacientes que padecían CaP o CaP metastásico, demostraron que, en el primer grupo de pacientes, los niveles séricos de oxLDL en comparación con otros biomarcadores y con los controles, aumentaban significativamente y más aún en pacientes que cursaban un cáncer de próstata metastásico (Wan et al., 2015). Dentro de este

mismo estudio, se demostró que oxLDL era capaz de estimular la proliferación de células PC-3 en comparación con el control y de regular al alza la expresión del gen ORL1 del receptor LOX-1 en estas mismas células de forma dependiente de la dosis. Por último, en ensayos de microarrays de proteínas demostraron que oxLDL fue capaz de modificar o activar diferentes vías de señalización tales como la vía NF- κ B, STAT 1 y STAT3, las que podrían ser responsables de la proliferación, migración y apoptosis tumoral inducida por oxLDL (Wan et al., 2015).

Por último, se ha demostrado que oxLDL no solamente influye en el inicio y progresión del cáncer, sino que también está involucrada en la eficacia del tratamiento empleado en la enfermedad. En un estudio realizado con anterioridad, se demostró que oxLDL interfiere en la eficacia del cisplatino como agente anticancerígeno en células de carcinoma de ovarios, y se observó un aumento en el IC₅₀ del fármaco cuando estas células fueron tratadas con oxLDL. Por otra parte, se ha observado que oxLDL estimula fenómenos de autofagia en células de osteosarcomas por la sobreexpresión de miR-155, lo que reduce la efectividad de la terapia en este tipo de cáncer, al menos *in vitro* (Bitorina et al., 2019)

Pese a que existe evidencia de que la lipoproteína de baja densidad oxidada plasmática se encuentra aumentada en pacientes oncológicos, y que la vía de señalización NF- κ B participan dentro de la fisiopatología del cáncer y la

resistencia al tratamiento, no se ha reportado hasta hoy la relación que estos factores tienen en el desarrollo, progresión y expresión de marcadores de resistencia a drogas en cáncer. Por lo anterior, surge la inquietud de conocer cuál es su relación con respecto al fenómeno de resistencia en un tipo de cáncer tan prevalente como el cáncer de próstata.

2. HIPÓTESIS

La activación de la vía de señalización NF- κ B p52-p65, por oxLDL, induce la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel mediante la sobreexpresión de MDR1 y TUBB3 en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración.

3. OBJETIVOS

a. Objetivo General:

- Analizar el efecto de oxLDL en la activación de la vía de señalización NF- κ B y en la generación de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración.

b. Objetivos específicos

- Determinar la función de oxLDL en la activación de la vía de señalización NF- κ B en modelos celulares de CPRC.
- Determinar la función de oxLDL en la expresión de marcadores relacionados a la resistencia a Cabazitaxel en CPRC.
- Determinar el papel de oxLDL y la activación de NF- κ B en la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel y la supervivencia celular en modelos celulares de CPRC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Objetivo específico 1: Determinar la función de oxLDL en la activación de la vía de señalización NF- κ B en modelos celulares de CPRC

Se analizó la expresión de proteínas propias de la activación de la vía NF- κ B en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a castración. Se realizaron cultivos celulares con células de cáncer de próstata resistente a castración C4-2B, 22RV1 y DU145. Estas fueron tratadas con 50 ng/mL de oxLDL con el fin de evaluar el efecto en marcadores específicos de la activación de la vía de señalización NF- κ B. Posterior al tratamiento, se realizó la extracción de proteínas, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, y luego se analizó la expresión de las proteínas relacionadas con la activación de la vía NF- κ B y sus respectivas formas fosforiladas mediante Wester Blot.

- Generación de cultivos celulares de líneas celulares C4-2B, 22RV1 y DU145.

Las líneas celulares C4-2B, 22RV1 y DU145 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.)

C4-2B: La línea celular humana C4-2B es una sublínea celular aislada desde metástasis óseas de xenoinjertos subcutáneos de células LNCaP en ratones

desnudos castrados. Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero fetal bovino (FBS) con 100 U/mL de penicilina y 0,1mg/mL, de estreptomycin y L-glutamina 2 mM y se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂ hasta confluencia adecuada.

22RV1: La línea celular 22RV1 es una línea celular epitelial de carcinoma de próstata humano-derivada de un xenoinjerto de CWR22 que se propagó en serie en ratones castrados. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml estreptomycin y L-glutamina 2 mM. Las células se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂ hasta confluencia adecuada.

DU145: La línea celular DU145 es derivada de una metástasis del sistema nervioso central, original de un adenocarcinoma de próstata primario. Son resistentes a la castración, no expresan PSA y expresan el receptor de andrógenos (AR). Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), 100 U/ml de penicilina y estreptomycin 0,1mg/ml y L-glutamina 2 mM. Las células se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂ hasta confluencia adecuada.

- **Tratamiento de cultivos celulares DU145, C4-2B y 22RV1 con oxLDL:**

Se cultivaron 500.000 células por pocillo de las líneas celulares C4-2B, 22RV1 y DU145 en placas de 12 pocillos hasta obtener una confluencia de aproximadamente un 80%. El mantenimiento de las células se llevó a cabo de

acuerdo con las condiciones antes descritas en el apartado **“Generación de cultivos celulares de líneas celulares C4-2B, 22RV1 y DU145”**. Las células fueron tratadas con 500 uL medio de cultivo RPMI suplementado con L-Glutamina y 100U/ml de penicilina/Estreptomicina al 0,1mg/ml, y que no contenía suero fetal bovino, con una concentración de oxLDL de 50 µg/mL. Como control negativo se utilizaron 500 µL de medio de cultivo en iguales condiciones anteriores, pero reemplazando la oxLDL por el volumen correspondiente de PBS. Las células fueron incubadas por 1 o 24 horas en estas condiciones en un incubador humidificado con 5% de CO₂, y para cada condición se realizó el experimento en triplicado.

- **Extracción y cuantificación de proteínas asociadas a la activación de la vía de señalización la vía NF-κB:**

Para la extracción de proteínas se utilizó RIPA Lysis Buffer System® (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX) suplementado con inhibidor de fosfatasas Phosphatase inhibitor cocktail C 1X (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX). Las células C4-2B, 22RV1 y DU145 se obtuvieron de los cultivos previamente tratados como se describió en el apartado **“Tratamiento de cultivos celulares DU145, C4-2B y 22RV1 con oxLDL”**, y se procedió con la extracción de proteínas según las indicaciones del fabricante, adicionando a cada 100 µL de reactivo 1, 1 µL de cada cocktail de inhibidor de proteasas (R2, R3 y R4) y 1 µL de cocktail de inhibidor de fosfatasas. Del total de la solución, se adicionaron 200 uL por cada pocillo con células, se dejaron incubar por 10 minutos en hielo.

Posteriormente, el lisado celular fue resuspendido repetidamente y almacenado en tubos de 1,5 mL a -20°. Las proteínas fueron cuantificadas utilizando el método de Bradford, y para ello, se adicionaron en una placa de 96 pocillos, 200 µL del reactivo *Pierce Coomassie Plus* (ThermoFisher Scientific, EE. UU.), y 5 µL de cada muestra a cuantificar y de la correspondiente curva de calibración de BSA, se resuspendió adecuadamente cada pocillo y la cuantificación se realizó en equipo SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- **Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot:**

Se sembraron 30 ug de proteínas totales extraídas de las células tratadas en las diferentes condiciones como se mencionó anteriormente en el apartado **“Tratamiento de cultivos celulares DU145, C4-2B y 22RV1 con oxLDL”** en un gel de 40% de acrilamida-Bis 37,5:1 al 12% y se resolvió a voltaje constante de 110 volt. Posterior a una resolución adecuada, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDFV (*inmovilon FL*) de 0,45 µm, en donde se utilizó el equipo de transferencia semi-seca *Trans-blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, EE. UU.) por 40 minutos, 25 volt y amperaje constante de 0,3 A. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% (p/v) en TBS 1X por 1 hora en agitación a temperatura ambiente. La membrana con los anticuerpos primarios correspondientes (tabla 3) se dejaron incubando en leche al 2,5% en TBS 1X suplementada con Tween 20 al 0,001% *overnight*. Posterior a ello, se realizaron

3 lavados sucesivos de cinco minutos cada uno con buffer de lavado TBS 1X, Tween 20 al 0,001% y SDS 0,1% y luego se aplicó el anticuerpo secundario correspondiente por una hora en agitación y a temperatura ambiente. Para la detección de la proteína por fluorescencia, se utilizó el equipo Odyssey CLX, LICOR (Texas, EE. UU.).

b. Objetivo específico 2: Determinar la función de oxLDL en la expresión de marcadores relacionados a la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel en CPRC.

Mediante Western Blot e inmunocitoquímica, se analizaron la expresión de marcadores asociados a la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a castración, específicamente MDR1 y TUBB3. Para ello, se realizaron cultivos celulares con células C4-2B, 22RV1 y DU145, los que fueron tratados con oxLDL como se ha descrito anteriormente. Posterior al tratamiento, se realizó la extracción y cuantificación de proteínas, la separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y la correspondiente identificación de los marcadores de interés mediante Western Blot, como también la preparación de los cultivos celulares para inmunocitoquímica.

- **Generación y tratamiento de cultivos celulares C4-2B, 22RV1 y DU145 con oxLDL para extracción de proteínas.**

Los cultivos fueron generados y procesados como se mencionó anteriormente en el apartado **“Generación de cultivos celulares en líneas celulares C4-2B, 22RV1 y DU145”** y **“Tratamiento de cultivos celulares DU145, C4-2B y 22RV1 con oxLDL”** respectivamente.

- **Extracción y cuantificación de Proteínas para análisis de marcadores asociados a resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a castración.**

Para la extracción de proteínas se utilizó RIPA Lysis Buffer System® (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX). Los cultivos se obtuvieron como se describió anteriormente y la extracción de proteínas se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante, adicionando a cada 100 µL de reactivo 1, 1 µL de cada cocktail de inhibidor de proteasas (R2, R3 y R4). Del total de la solución, se adicionaron 200 µL por cada pocillo con células, dejándose incubar por 10 minutos en hielo. Posteriormente, el lisado celular fue resuspendido repetidamente y almacenado en tubos de 1,5 mL a -20°. Las proteínas fueron cuantificadas utilizando el método de Bradford, y para ello, se adicionaron en una placa de 96 pocillos, 200 µL del reactivo *Pierce Coomassie Plus* (ThermoFisher Scientific, EE. UU.), y 5 µL de cada muestra a cuantificar y de la correspondiente curva de calibración de BSA, se resuspendió adecuadamente cada pocillo y la cuantificación se realizó en

equipo SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- **Análisis por Western Blot de MDR1 y TUBB3 como marcadores de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel:**

El análisis de los marcadores de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel (ABCB1 y TUBB3) se realizó como se describió en el apartado “**Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot**”. Los anticuerpos primarios utilizados para este experimento se informan en la tabla 3 y los anticuerpos secundarios en la tabla 4.

- **Análisis de la expresión de MDR1 como marcador de resistencia a drogas en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración mediante inmunocitoquímica.**

Generación de cultivos celulares de líneas celulares C4-2B, 22RV1 y DU145:

Las líneas celulares 22RV1, C4-2B y DU145 fueron cultivadas hasta aproximadamente un 80% de confluencia como se describió anteriormente.

Posterior al tiempo de incubación, las células se tripsinizaron, se contaron y se agregaron aproximadamente 100.000 células por pocillo de cada línea celular sobre vidrios tratados previamente con 200 µL de Poli-L-lisina al 0,01%, en placas de 24 pocillos. Las células se dejaron en cultivo como se ha descrito anteriormente hasta una confluencia adecuada. Posteriormente, se realizó el cambio de medio de cultivo por 500 µL de medio con oxLDL a una concentración

de 50 mg/mL, preparada en RPMI al 10% de suero fetal bovino, y se dejaron en incubación por 24 horas. Luego, las células fueron lavadas con 300 μ L de PBS 1X, dos veces, y posteriormente se adicionaron 300 μ L de solución fijadora de paraformaldehído al 4% y se dejó incubar por 30 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación las células se lavaron dos veces con PBS 1x, se adicionaron 300 μ L de Tritón-x100 al 1% para su permeabilización y se dejó incubar las células por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar nuevamente dos veces con PBS 1X, se procedió a bloquear las células con 300 μ L de BSA al 1% y se dejó incubando la placa con las células por 30 minutos a temperatura ambiente.

Una vez realizado el bloqueo, se adicionaron, en una cámara húmeda, gotas de 30 μ L de anticuerpo primario preparado en BSA al 1% p/v (tabla 5), dejando los vidrios con las células sobre el anticuerpo y se incubaron las células por toda la noche, a 4°C. Por último, las células fueron lavadas nuevamente con PBS 1X, y se realizó la incubación con anticuerpo secundario por 4 horas (tabla 6), a 4°C. Se realizaron nuevos lavados para incubar luego con Faloidina-TexasRed para la tinción del citoesqueleto de las células, por 10 minutos a temperatura ambiente para finalmente entre estos lavados, incubar las células por 3 minutos con DAPI para la tinción del núcleo celular.

Los vidrios fueron montados con medio de montaje en portaobjetos y las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81

a un aumento de 60X y analizadas mediante el software Fiji ImageJ 1,53c, National Institutes of Health, USA.

c. Objetivo específico 3: Analizar el papel de oxLDL y el aumento en la sobrevida celular y resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel en líneas celulares de CRPC.

Para la determinación del efecto de oxLDL en la activación de la vía NF- κ B y en la sobrevida celular cuando las células fueron tratadas con Docetaxel y Cabazitaxel, se realizaron cultivos celulares con células C4-2B, 22RV1 y DU145 como se ha mencionado anteriormente. Posterior a esto, ambos cultivos fueron tratados con oxLDL por 24 horas y luego tratados con concentraciones crecientes de Docetaxel y Cabazitaxel para posteriormente realizar ensayos de supervivencia celular y citotoxicidad en distintas condiciones.

- Tratamiento de cultivos celulares C4-2B, 22RV1 y DU145 para ensayos de supervivencia celular y citotoxicidad:

Los tratamientos a las células se realizarán como se ha descrito anteriormente.

- Ensayos de citotoxicidad para determinar el porcentaje de supervivencia celular de 22RV1, DU145 y C4-2B a Docetaxel y Cabazitaxel:

Las líneas celulares C4-2B, 22RV1 y DU145 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 5000 células por pocillo con medio RPMI

suplementado con un 2.5% de suero fetal bovino hasta confluencia adecuada. Luego, las células fueron tratadas por 24 horas con 100 μ L de oxLDL en una concentración de 25 μ g/mL preparado en medio RPMI al 2,5% de SFB, y para el caso del control, los 100 μ L de RPMI fueron suplementados en el volumen correspondiente con PBS 1X. Posteriormente, los cultivos celulares fueron tratados con 100 μ L de Cabazitaxel y Docetaxel, por separado, en concentraciones crecientes según la línea celular y su correspondiente IC50, en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 2.5% (tabla 7). Para el caso de los controles, el volumen de droga en el medio RPMI, fue suplementado con el volumen correspondiente de DMSO. Las células se mantuvieron en cultivo por 5 días, incluyendo los días de tratamientos en donde se monitoreó el progreso de la supervivencia celular obteniendo imágenes mediante el equipo Odyssey CLX, LI-COR (Texas, EE. UU.). Por último, al final del día 5, las colonias se fijaron a la placa con etanol al 70% (v/v), se incubaron las placas por 15 minutos a temperatura ambiente, para finalmente teñir con 40 μ L de cristal violeta incubando 5 minutos a temperatura ambiente, y realizando el lavado correspondiente. La imagen final para el análisis de la supervivencia celular en cada condición analizada se obtuvo mediante el equipo Odyssey CLX, LI-COR (Texas, EE. UU.).

d. Análisis de expresión de receptores scavenger para oxLDL en bases de datos públicas.

Para determinar la sobreexpresión de los receptores scavenger relacionados con la captación e internalización de oxLDL en los distintos estadios del cáncer de próstata, se obtuvieron los datos de expresión de los receptores de interés en una base de datos pública depositada en el sitio web NCBI, *Gene Expression Omnibus Profile* (GEO Profile) para tejido prostático normal, tumores primarios y metástasis de cáncer de próstata. Los datos fueron analizados como se describe en el apartado siguiente.

e. Análisis de datos e imágenes:

Todos los datos obtenidos en los diferentes experimentos fueron graficados y analizados utilizando el software Graphpad Prism 9.0.2. y las imágenes correspondientes fueron analizadas mediante el software FIJI ImageJ. Los análisis estadísticos de los datos se realizaron mediante las pruebas estadísticas adecuadas para cada caso asumiendo una distribución no-paramétrica de los datos y un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 3: Anticuerpos primarios utilizados en identificación de marcadores de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel y activación de p65-NF-kB y p52-NF-kB

Anticuerpo	Proveedor	Código	Especie	Tipo	Título
Anti-MDR1 (D-11)	Santa Cruz Biotechnology	sc-55510	Mouse	monoclonal	1:500
Anti- TUB β III (2G10)	Santa Cruz Biotechnology	sc-80005	Mouse	Monoclonal	1:3000
Anti p65-NF-kB (F-6)	Santa Cruz Biotechnology	sc-8008	Rabbit	Monoclonal	1:2000
Anti-p-p65-NF-kB (s536)	Cell Signalling	7F1	Mouse	Monoclonal	1:2000
Anti p52-NF-kB (C-5)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7386	Mouse	Monoclonal	1:2000
Anti-GAPDH (0411)	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724	Mouse	Monoclonal	1:6000

Tabla 4: Anticuerpos secundarios utilizados en identificación de marcadores de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel y activación de p65-NF-kB y p52-NF-kB

Anticuerpo	Proveedor	Código	Especie	Tipo	Título
Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor® 790	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	715655150	Donkey	Policlonal	1:10000
Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor® 680	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	715625150	Donkey	Policlonal	1:10000
Anti-IgG de conejo (H+L) Alexa Fluor® 680	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	711625152	Donkey	Policlonal	1:10000

Tabla 5: Anticuerpo primario utilizado en inmunocitoquímica para MDR1

Anticuerpo	Proveedor	Código	Especie	Tipo	Título
Anti-MDR1 (D-11)	Santa Cruz Biotechnology	sc-55510	Mouse	monoclonal	1:100

Tabla 6: Anticuerpo secundario utilizado en inmunocitoquímica para MDR1

Anticuerpo	Proveedor	Código	Especie	Tipo	Título
Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor® 790	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	715655150	Donkey	Policlonal	1:10000

Tabla 7: Concentraciones de Docetaxel y Cabazitaxel utilizadas en ensayos de citotoxicidad en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B para determinar el porcentaje de viabilidad celular ante estas drogas.

Línea celular	Docetaxel (nM)	Cabazitaxel (nM)
22RV1	0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0	0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0
DU145	0, 1.25 2.5, 5.0, 10.0, 20.0	0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0
C4-2B	0, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0	0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0

3. RESULTADOS

a. La oxLDL incrementa los niveles p-p65- NF- κ B en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración 22RV1, C4-2B y DU145.

Se ha reportado que la vía de señalización NF- κ B está relacionada con la resistencia a la terapia en diversos tipos de cáncer, mediando este fenómeno a través de la regulación de genes anti apoptóticos y producción de citoquinas proinflamatorias que activan otras vías de señalización como JAK/STAT, JNK entre otras (P. Kroon et al., 2013), junto a la expresión de transportadores de resistencia a múltiples drogas (MDRs). En este sentido, analizamos el efecto de oxLDL en activación de la vía NF- κ B a través del análisis de expresión de la forma fosforilada de p65 NF- κ B (fosforilación ser356) en tres líneas celulares de CRPC (DU145, C4-2B y 22RV1). Los resultados demuestran que el tratamiento con 50 ug/mL de oxLDL genera un aumento significativo en la expresión de la forma activa de p65 en 1.3 veces para DU145, 1.697 veces en C4-2B y 1.265 veces en la línea 22RV1 (Figura 1). Esto sugiere que oxLDL puede activar la vía canónica de NF- κ B, pero no se puede descartar la activación de la vía no canónica de NF- κ B.

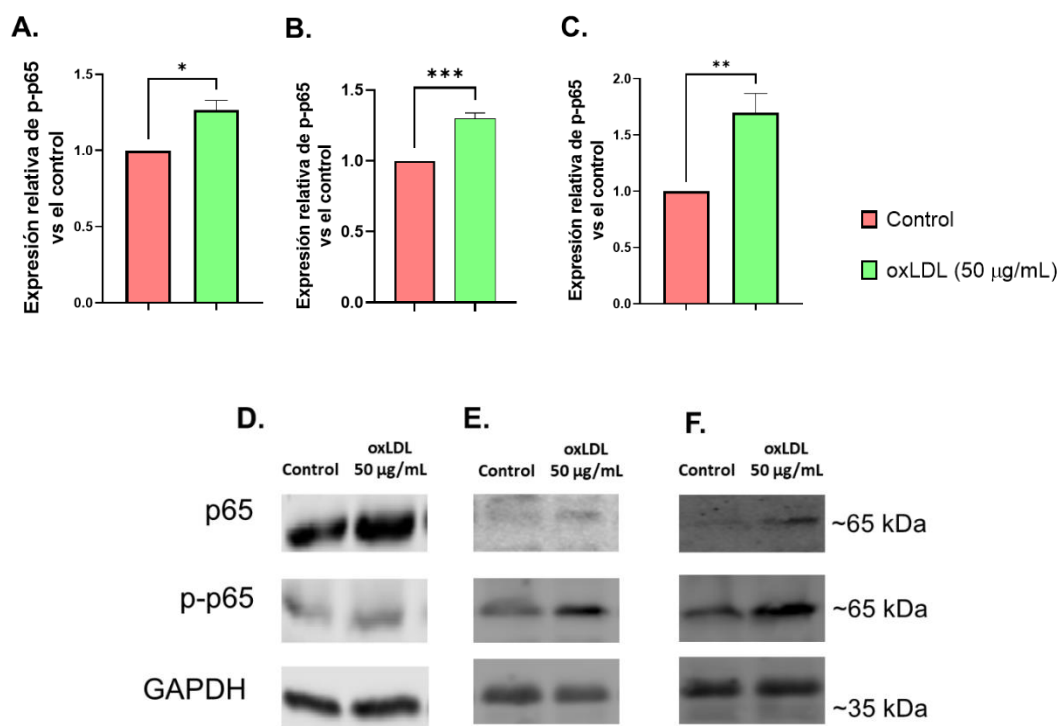


Figura 1: Cuantificación relativa de la expresión de p-p65 respecto a control sin tratamiento. Las células CRPC (22RV1, DU145 y C4-2B) fueron tratadas con oxLDL 50µg/mL por 1 hora para luego analizar la expresión de p-p65 NK-kB mediante western blot. A) Gráfico de la expresión p-p65 en células 22RV1. B) Gráfico de la expresión de p-p65 en células DU145. B) Grafico de la expresión de p-p65 en células C4-2B. Las gráficas representan la expresión relativa de p-p65 normalizada por GAPDH respecto al control sin oxLDL (50 ug/mL). Análisis de la expresión de p65 y p-p65 mediante Western Blot para las líneas celulares CRPC 22RV1 (D), DU145 (E) y C4-2B (F). Las intensidades de fluorescencia de cada banda fueron analizadas con el software Image Studio Lite y se evaluó la significancia estadística mediante el análisis de t-student (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,0001$) $n=3$.

b. La oxLDL activa la vía de señalización p52- NF- κ B en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración DU145 y C4-2B.

Como se describió en el resultado anterior, oxLDL activa la vía canónica de NF- κ B mediante la fosforilación de la subunidad p65, pero no se puede descartar que la vía no canónica de NF- κ B pudiese ser activada. Por lo anterior, se analizó la expresión de la forma activa de la vía no canónica de NF- κ B, p52, para las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B. Los resultados muestran que oxLDL genera un aumento en la expresión de p52 en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B. La sobreexpresión de p52 fue de 1,21, 1,16 y 1,21 veces respectivamente en comparación con el control sin tratamiento. Estos resultados sugieren que oxLDL, al igual que en el caso anterior, es capaz de activar la vía no canónica de NF- κ B en las líneas celulares DU145 y C4-2B.

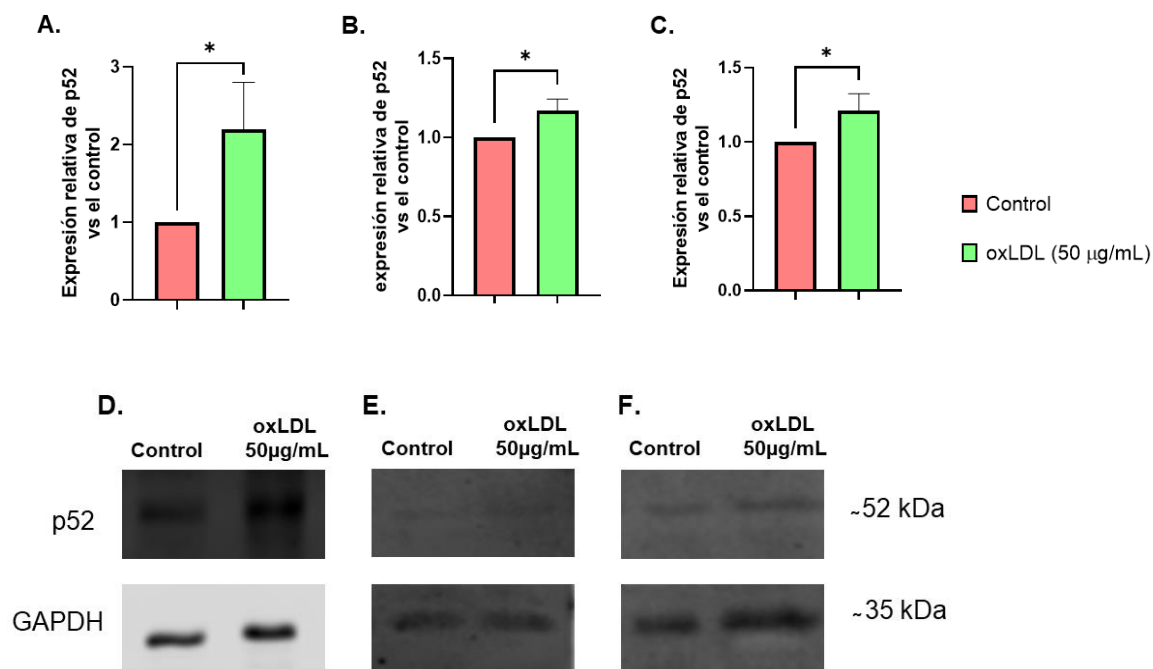


Figura 2: Cuantificación relativa de la expresión de p52 respecto a control sin tratamiento. Las células CRPC (DU145 y C4-2B) fueron tratadas con oxLDL 50µg/mL por 1 hora para luego analizar la expresión de p52 NK-κB mediante western blot. A) Gráfico de la expresión de p52 en células 22RV1. B) Gráfico de la expresión de p52 en células DU145. C) Gráfica de la expresión de p52 en células C4-2B. Las gráficas representan la expresión relativa de p52 normalizada por GAPDH respecto al control sin oxLDL (50 ug/mL). Análisis de la expresión de p52 mediante Western Blot para las líneas celulares CRPC 22RV1 (D), DU145 (E) y C4-2B (F). Las intensidades de fluorescencia de cada banda fueron analizadas con el software Image Studio Lite y se evaluó la significancia estadística mediante el análisis de t-student (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,001$), $n=3$

c. La oxLDL induce la expresión del marcador de resistencia MDR1 en las líneas celulares de CRPC 22RV1, DU145 y C4-2B.

Se ha reportado que las proteínas MDR son responsables de la resistencia a taxanos en diversos tipos de cáncer como el cáncer de próstata resistente a la castración, y la modulación de su expresión es regulada al alza por la activación de la vía NF- κ B. En base a los resultados reportados anteriormente en esta tesis nos preguntamos cuál es el efecto de oxLDL en la expresión de MDR1 en las líneas celulares CRPC 22RV1, DU145 y C4-2B. Por ello, se analizó mediante western blot la expresión de MDR1 inducida por oxLDL en las líneas celulares de CRPC 22RV1 DU145 y C4-2B. Los resultados muestran que oxLDL promueve la sobreexpresión de MDR1 en estas líneas celulares DU145 y C4-2B. La expresión de este marcador de resistencia aumenta 1,89 y 1,72 veces respectivamente, en comparación con el control. Para la línea 22RV1 la expresión de MDR1 no es significativa con un intervalo de confianza de $p < 0,005$, pero esta si es significativa para un intervalo de confianza de $p < 0,3$ en 2,149 veces con respecto al control. Esto nos permiten sugerir que la sobreexpresión de MDR1 en las líneas celulares analizadas es estimulada por la acción de la oxLDL a la concentración analizada.

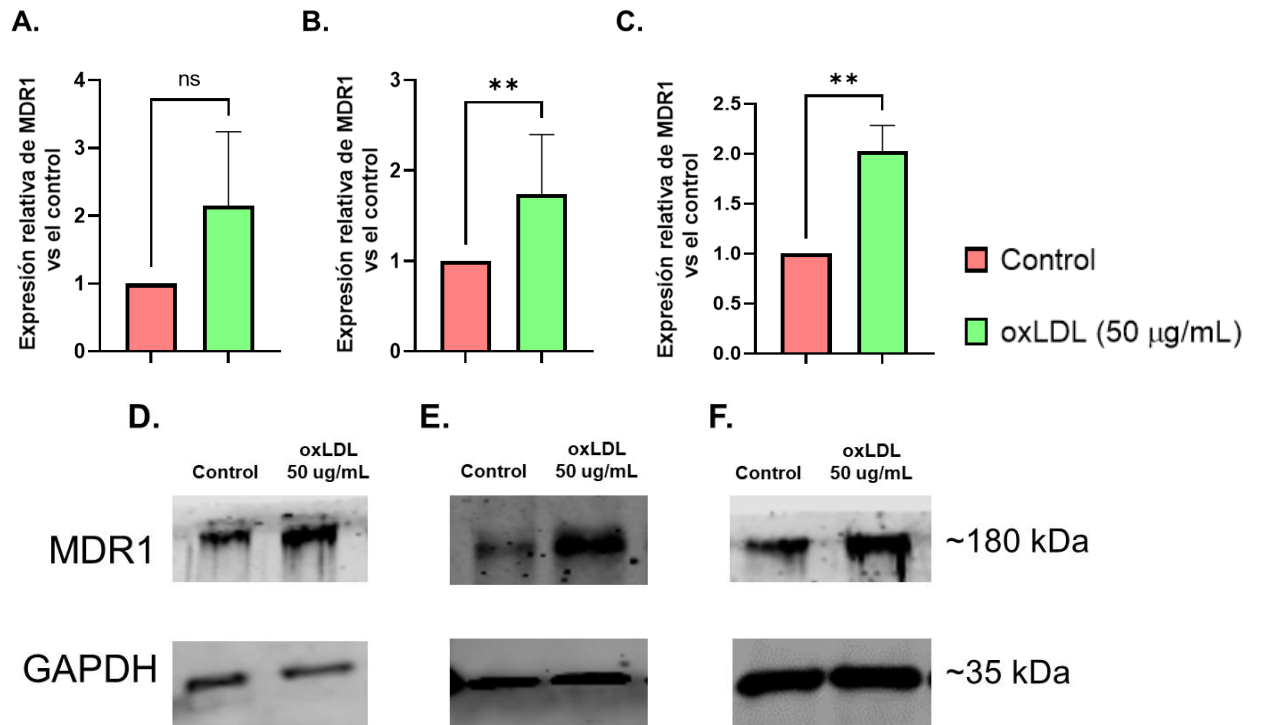


Figura 3: Cuantificación relativa de la expresión de MDR1 respecto a control sin tratamiento. Las células CRPC (22RV1, DU145 y C4-2B) fueron tratadas con oxLDL 50µg/mL por 24 horas para luego analizar la expresión de MDR1 por western blot. A) gráfico de la expresión de MDR1 en células 22RV1. B) Gráfico de la expresión de MDR1 en células DU145. C) Gráfico de la expresión MDR1 en células C4-2B. Las gráficas representan la expresión relativa de MDR1 normalizada por GAPDH respecto al control sin oxLDL (50 ug/mL). Análisis de la expresión de MDR1 mediante Western Blot para las líneas celulares CRPC 22RV1 (D), DU145 (E) y C4-2B (F) Las intensidades de fluorescencia de cada banda fueron analizadas con el software Image Studio Lite y se evaluó la significancia estadística mediante el análisis de t-student (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,001$) $n=3$.

d. La oxLDL induce la expresión del marcador de resistencia TUBB3 en las líneas celulares de CRPC 22RV1, DU145 y C4-2B.

Además de la expresión de transportadores MDR1, otro de los marcadores clásicos de resistencia taxanos en el cáncer de próstata resistente a castración, es la expresión de una isoforma de β -tubulina, la TUBB3, la cual no presenta los dominios de unión a taxanos, generando el fracaso de en la terapia con estos fármacos. Al igual que para los transportadores MDR la vía de señalización NF- κ B, las vías JAK/STAT y la vía JKN también contribuyen a la expresión de TUBB3. Se determinó mediante Western Blot la expresión de TUBB3 en las líneas celulares de CRPC C4-2B, DU145 y 22RV1, tratadas con oxLDL a una concentración de 50 μ g/mL por 24 horas. Los resultados muestran que oxLDL genera un aumento significativo en la expresión de TUBB3 para las líneas celulares 22RV1 y DU145 con un aumento de 2,3 y 1,3 veces respectivamente en comparación con el control sin tratamiento. Por otra parte, en la línea celular C4-2B si bien hay un aumento de TUBB3 en 1,81 veces con respecto al control, esta no es significativa estadísticamente con un intervalo de confianza de $p < 0,005$, pero si con un intervalo de confianza de $p < 0,01$. Los resultados permiten determinar que oxLDL induce la expresión de TUBB3 en las líneas celulares de CRPC.

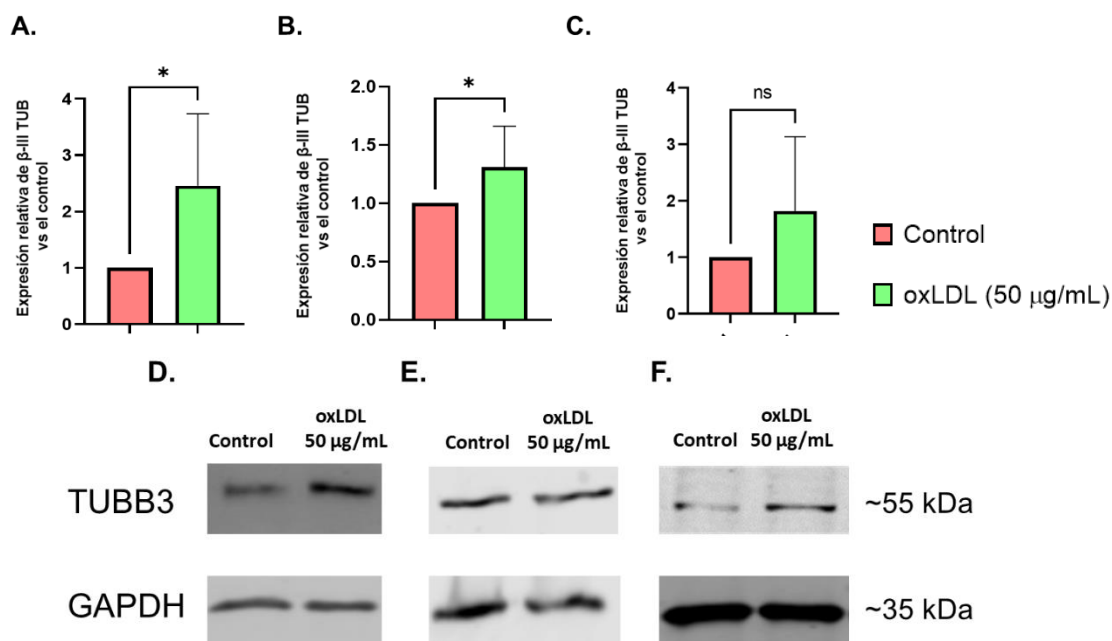


Figura 4: Cuantificación relativa de la expresión de TUBB3 respecto a control sin tratamiento. Las células CRPC (22RV1, DU145 y C4-2B) fueron tratadas con oxLDL 50µg/mL por 24 horas para posteriormente analizar la expresión de TUBB3 por western blot. A) grafico de la expresión TUBB3 en células 22RV1. B) Grafico de la expresión de TUBB3 en células DU145. C) Grafico de la expresión TUBB3 en células C4-2B. Las gráficas representan la expresión relativa de TUBB3 normalizado por GAPDH respecto al control sin oxLDL (50 ug/mL). Análisis de la expresión de TUBB3 mediante Western Blot para las líneas celulares CRPC 22RV1 (D), DU145 (E) y C4-2B (F) Las intensidades de fluorescencia de cada banda fueron analizadas con el software Image Studio Lite y se evaluó la significancia estadística mediante el análisis de t-student (*p≤0,05, **p≤0,001, *** p≤0,001), n=3.

e. MDR1 es expresada en la membrana celular cuando las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B son tratadas con oxLDL.

En la literatura se ha reportado que la proteína de multirresistencia a drogas MDR1 funciona como una bomba de eflujo de fármacos que se emplean en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración como los taxanos Docetaxel y Cabazitaxel. Se analizó la localización de MDR1 en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B tratadas con oxLDL mediante inmunocitoquímica y posteriormente se analizó la colocalización de MDR1 en el contexto celular mediante el software FIJI de ImageJ.

Los resultados muestran que en las células que fueron tratadas con oxLDL por 24 horas, MDR1 se localiza en la membrana celular, mientras que en el caso de las células que no fueron tratadas con oxLDL, la mayor parte de la señal correspondiente a MDR1, se encuentra en el espacio intracelular.

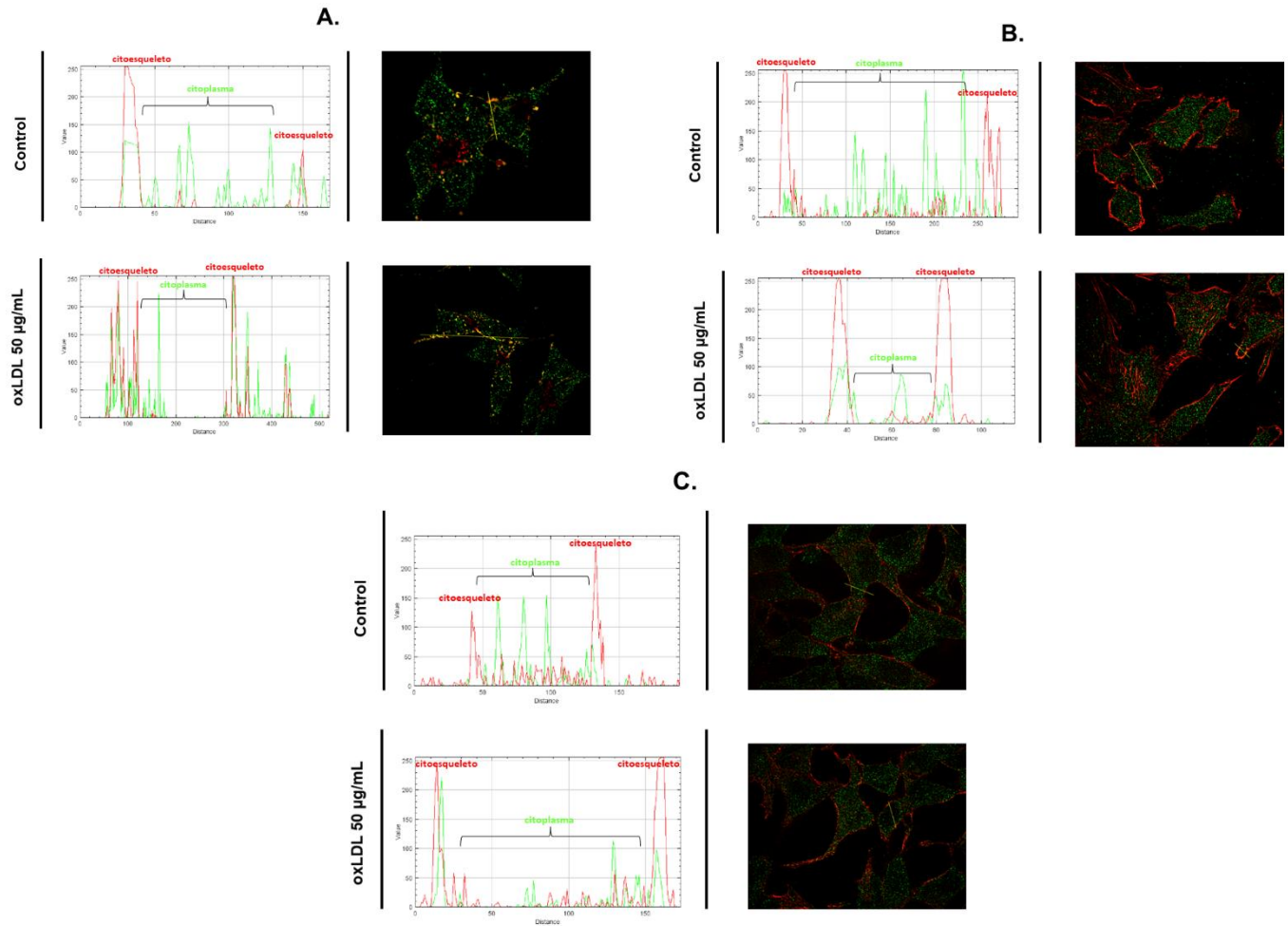


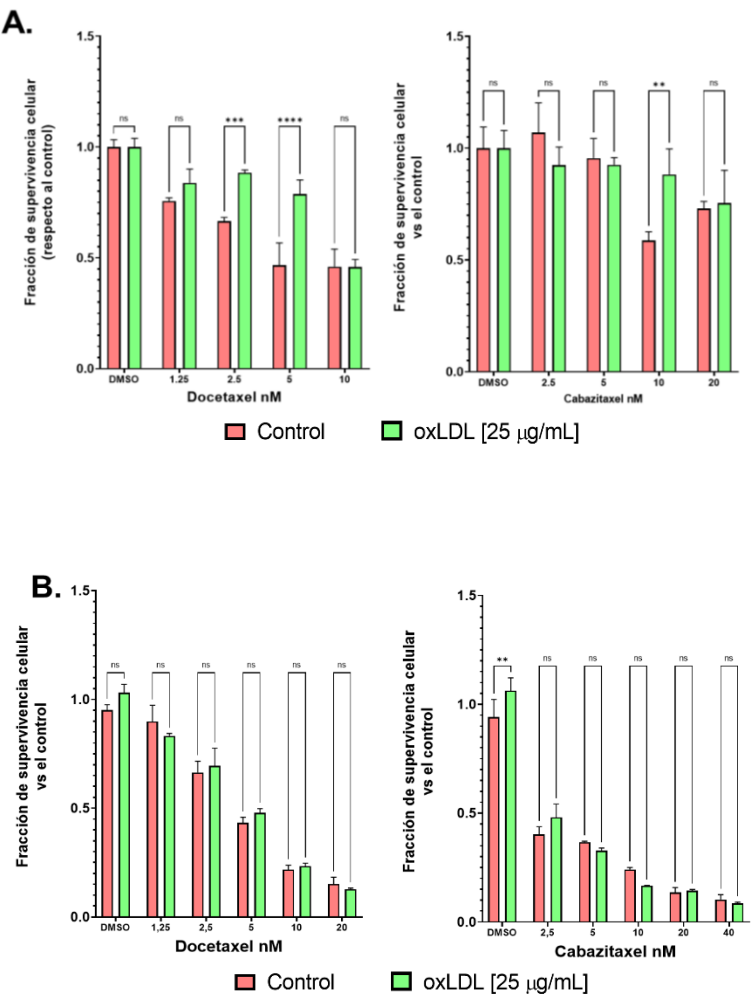
Figura 5: Colocalización de MDR1 con la membrana celular en las líneas celulares 22RV1 (A), DU145 (B) y C4-2B (C). Las líneas celulares fueron tratadas con oxLDL a una concentración de 50 µg/mL por 24 horas contra control sin tratamiento. El análisis de colocalización se realizó mediante el software FIJI de ImageJ v 1.53c. Para determinar la posición de MDR1 dentro de las células se utilizó el plugin RGB profile, se realizó la sustracción de background con la eliminación de puntos menores a 10 píxeles, ajuste de brillo y contraste a todas las imágenes con un mínimo y máximo de 30/135. Las determinaciones se

realizaron en regiones aleatorias de la microfotografía. En rojo: citoesqueleto, en verde: MDR1.

f. La sobrevida celular de 22RV1, DU145 y C4-2B frente al tratamiento con Docetaxel y Cabazitaxel aumenta cuando las líneas celulares son tratadas previamente con oxLDL.

Los resultados obtenidos hasta este punto muestran que existe una sobreexpresión de marcadores de resistencia como MDR1 y TUBB3, mediada posiblemente por la activación de la vía NF- κ B canónica y no canónica en los modelos celulares de CRPC, y por esto se puede proponer que: la oxLDL genera un aumento de la sobrevida celular mediado por la activación de NF- κ B y la sobreexpresión de MDR-1 y TUBB3. Se analizó la viabilidad celular en las líneas 22RV1, DU145 y C4-2B tratadas con oxLDL por 24 horas para luego ser tratadas con concentraciones crecientes de Docetaxel o Cabazitaxel por 72 horas. La viabilidad celular fue analizada por tinción con cristal violeta. Los resultados obtenidos muestran el oxLDL genera un aumento en la viabilidad celular en las líneas celulares 22RV1 para concentraciones de 2,5 y 5,0 nM de Docetaxel y 10,0 nM de Cabazitaxel con respecto al control sin tratamiento con oxLDL. Por otra parte, la viabilidad celular en las células C4-2B aumenta significativamente con respecto al control sin oxLDL excepto en la concentración de 1,25 nM de Docetaxel, mientras que la supervivencia celular aumenta a una concentración de 2,5 nM de Cabazitaxel en las condiciones antes mencionadas. En cambio, para la células DU145 no se observa un aumento significativo de sobrevida celular con respecto al control para el caso de Docetaxel, al igual que para Cabazitaxel. Estos resultados permiten sugerir que oxLDL genera un aumento en

la sobrevida celular en las líneas celulares 22RV1 y C4-2B que puede estar mediada por la sobreexpresión de MDR1 y β -III TUB, y la activación tanto canónica como no canónica de la vía NF- κ B.



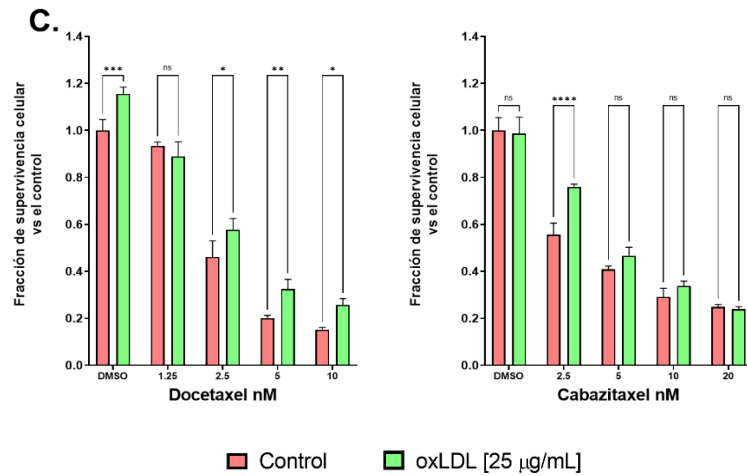


Figura 8: Ensayos de citotoxicidad frente a Docetaxel y Cabazitaxel en líneas celulares 22RV1 (A), DU145 (B) y C4-2B (C). Las líneas celulares fueron tratadas con 25 µg/mL de oxLDL por 24 horas, y posteriormente fueron tratadas con concentraciones crecientes de Docetaxel y Cabazitaxel por 72 horas. Los cultivos fueron fijados y teñidos con cristal violeta para obtener las imágenes de punto final de la viabilidad celular mediante el equipo Odyssey CLX, LI-COR (Texas, EE. UU.). La significancia estadística de los resultados se analizó mediante la prueba 2-way-ANOVA (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,001$).

g. Los receptores scavenger para oxLDL se encuentran aumentados en tumores primarios de próstata y metástasis en comparación con el tejido prostático normal.

Nuestros resultados demuestran que oxLDL es relevante en la expresión y la generación de los mecanismos de resistencia a taxanos en CRPC. Por otra parte, existen una serie de receptores afines a esta lipoproteína oxidada que podrían estar mediando los efectos observados en la presente tesis. En este sentido, los receptores scavenger interaccionan con oxLDL generando la activación de vías como NF- κ B, STAT, y vía de supervivencia celular las cuales están relacionadas a la resistencia a múltiples drogas. Es por esto, que utilizando base de datos publicas disponibles en GEO PROFILE se analizó la expresión de estos receptores en la glándula prostática normal, en tumores primarios de próstata y en cáncer metastásico, para determinar la expresión de receptores scavengers en diversos estadios del CaP. Los resultados muestran que, el receptor LOX-1 y CD36 aumentan de forma significativa tanto en los tumores primarios de próstata como cuando ocurre metástasis en comparación con el tejido prostático normal, sin embargo, MSR1 mantiene su expresión en todos los estadios de la enfermedad al igual que en el tejido de próstata normal. Por otra parte, se observa que el receptor para lipoproteína de baja densidad nativa, LDLR, disminuye su expresión en los tumores primarios y metástasis del cáncer de próstata con respecto al tejido prostático normal.

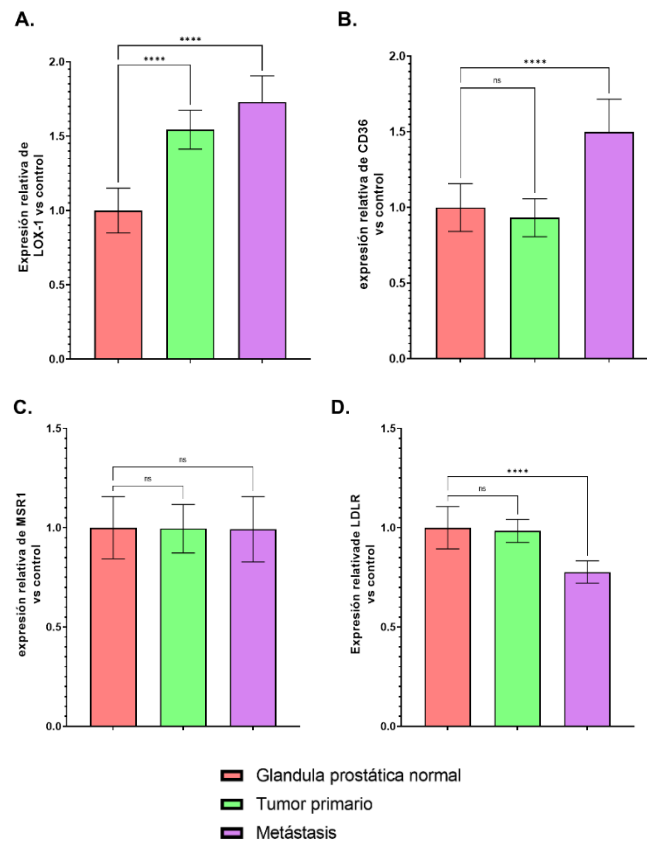


Figura 6: Niveles de expresión de receptores scavenger para oxLDL LOX-1 (A), CD36 (B), MSR1 (C) y LDL nativa, LDLR (D) en distintos estadios del cáncer de próstata. Los datos fueron obtenidos de la base de datos GEO PROFILE NCBI. Se seleccionaron los receptores scavenger relacionados con la internalización de la oxLDL y LDL nativa. Se analizó la expresión de estos receptores en tejido normal, en tumores primarios y en metástasis utilizando la base de datos GEO PROFILE de NCBI, en el conjunto de datos GDS2545. La significancia estadística de los datos se determinó mediante el software GraphPad Prism v 9.0.2 con el análisis one-way-ANOVA (**** $p \leq 0,0001$).

5. DISCUSIÓN

Actualmente, se conoce que el cáncer de próstata a pesar de ser una enfermedad de lenta progresión presenta una tasa de incidencia que aumenta año a año. El diagnóstico y el tratamiento del cáncer de próstata dependen de la etapa en la que se encuentre la enfermedad, en donde los estadios avanzados de la enfermedad son tratados con castración química, debido a la relevancia de los andrógenos en la progresión del CaP. Cuando el CaP avanza a pesar de haber recibido tratamiento previo, se genera un cáncer de próstata resistente a andrógenos, conocido como cáncer de próstata resistente a castración. El CRPC es tratado principalmente con antagonistas del receptor de andrógenos, inhibidores de la síntesis de andrógenos o con taxanos como Docetaxel o Cabazitaxel. Lamentablemente, muchas de estas terapias generan resistencia en un corto periodo de tiempo luego de ser iniciadas, por lo cual el estudio de este fenómeno es de una relevancia sustancial en el tratamiento del CRPC. En particular la presente tesis se enfocó en la resistencia a taxanos. Nuestros resultados demuestran que oxLDL activa la vía canónica y no canónica de NF- κ B aumentando la expresión de marcadores de resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel, generando como consecuencia funcional un aumento en la sobrevivencia de las células CRPC a los taxanos.

a. La oxLDL activa la vía de señalización NF- κ B mediante p65 en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración 22RV1, C4-2B y DU145.

Nuestros resultados mostraron que oxLDL induce la fosforilación activadora de la subunidad NF- κ B-p65 en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B. La vía de señalización NF- κ B es una vía de señalización que está relacionada con la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa (Hayden et al., 2006), la muerte celular programada, como también funciones fisiológicas de varios sistemas celulares como el sistema hepático, epidérmico y nervioso. La regulación inadecuada de la muerte celular vía NF- κ B trae consecuencias patológicas que dan resultado enfermedades como la aterosclerosis y el cáncer, donde su actividad errática impide, entre muchas otras cosas, la eficacia de las terapias contra la patología. (Dutta et al., 2006).

La evidencia existente para otras patologías como la aterosclerosis ha mostrado que oxLDL es capaz de activar la vía NF- κ B. Un ejemplo de ello es que oxLDL, al unirse al receptor scavenger LOX-1 es capaz de activar la vía de señalización NF- κ B en células endoteliales, disminuye la producción de NO, lo que conduce a la activación de un proceso inflamatorio mediante esta vía de señalización, con la consiguiente transformación celular. También, oxLDL y LOX-1 mediante la activación de la vía NF- κ B, estimulan la producción de moléculas de adhesión como VCAM-1, MCP-1. Son estas

mismas moléculas las que regulan al alza la expresión del receptor y la captación cíclica de oxLDL con los consecuentes efectos patológicos. (Kattoor et al., 2019)

Varias líneas de evidencia sugieren que los miembros de la familia NF- κ B están involucrados también en el crecimiento tumoral y metástasis, y específicamente los genes para c-rel, NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65) y Bcl-3 están ubicados en sitios de reordenamientos genómicos en el cáncer, (Mercurio & Manning, 1999) y apoyados en esta evidencia es de esperar que en el cáncer de próstata también ocurra una activación de la vía NF- κ B con consecuencias patológicas. De hecho, se sabe que, en los procesos de resistencia a la castración en el cáncer de próstata, la vía de señalización NF- κ B p65 esta constitutivamente activa e involucrada en el desarrollo y progresión de esta etapa del CaP (Chandrasekar et al., 2015a). Interesantemente, los genes de NF- κ B que se encuentran en mayor proporción en la célula, son p65 y p50, y estos se han relacionado específicamente con los procesos de supervivencia celular, invasión y metástasis en cáncer (Jain et al., 2012).

Otras evidencias que respaldan los resultados obtenidos muestran que este fenómeno no es exclusivo de un tipo de cáncer y que se ha observado por ejemplo un aumento en la inmunotinción de NF- κ B, y de la actividad de p65-p50 asociados con la progresión en carcinomas del cuello uterino (Nair et al.,

2003.), una mayor translocación nuclear de RelA en células de carcinomas gástricos en comparación con las células normales, como también se han encontrado proteínas I κ B α defectuosas en tumores de mama, colon, ovario, páncreas, vejiga, melanoma y próstata (Rayet et al., 1999.)

Específicamente en el CaP, investigadores demostraron que la fosforilación activadora de p65 analizada en este trabajo, la ser536, está presente en la mayoría de los casos de cáncer de próstata. En ese estudio, se generaron mutantes de p65 no fosforilables en ser536 (S536A) y mutantes activos fosfomiméticos de p65 ser536 para realizar las comparaciones, en donde se obtuvo que NF- κ B p65 ser536 aumenta en CaP fenómenos de invasión celular y transformación de células PTN1, una línea celular de próstata normal inmortalizada, en fenotipos cancerosos de próstata (L. Zhang et al., 2015).

En cuanto a los efectos que ejerce la activación de NF- κ B en la eficacia a la terapia, investigadores han demostrado con anterioridad que, en líneas celulares de cáncer de próstata como DU145 y 22RV1, hay un aumento de la resistencia a Docetaxel por activación de NF- κ B, mediante la sobreexpresión de la proteína de resistencia a multidroga, MDR1 (O'Neill et al., 2011), lo que respalda el posterior análisis de la sobreexpresión de esta proteína en las líneas celulares trabajadas para establecer si ambos factores se pueden relacionar, por ejemplo, con fenómenos de resistencia.

Por lo anterior, y en base a nuestros resultados, postulamos que la oxLDL es capaz de aumentar la expresión de p-p65 en líneas celulares de cáncer de próstata, y que esta activación podría estar involucrada en procesos patológicos como el aumento de la supervivencia celular y resistencia al tratamiento en CRPC.

b. La oxLDL activa la vía de señalización p52- NF- κ B en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración 22RV1, C4-2B y DU145

Nuestros resultados muestran que existe una sobreexpresión de p52 en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B cuando estas líneas celulares son tratadas con oxLDL. La vía no canónica de NF- κ B se ha visto involucrada en diversos procesos fisiológicos como la organogénesis y la inmunidad humoral, pero también se ha visto aumentada en procesos patológicos como los linfomas de células T y B, el cáncer de mama (Dejardin et al., 1998) y también en el cáncer de próstata (Nadiminty et al., 2010). Recientemente, la vía NF- κ B p100/p52 ha sido de interés en la investigación del CaP, ya que podría considerarse como un posible blanco terapéutico, al igual que la vía canónica de NF- κ B, p65. Con respecto a lo anterior, el procesamiento de p100 a p52 a través de moléculas como la Linfotoxina β , el factor activador de células B, el ligando CD40 y STAT3 en el cáncer de próstata, conducen a una hiperplasia significativa y un crecimiento inducido de la enfermedad resistente a la

castración en donde se observó que p52 puede activar AR durante la progresión de CRPC (Chandrasekar et al., 2015a) lo que sugiere que la vía NF-κB p52 cumple un rol en la progresión y desarrollo de estadios avanzados de la enfermedad. Por otra parte, otros investigadores demostraron que NF-κB p52 efectivamente se encontraba sobreexpresado en tejidos de pacientes con cáncer de próstata agresivo y se relacionaba con un mal pronóstico de la enfermedad. También, se ha observado que NF-κB p52 se transloca al núcleo en líneas celulares de cáncer de próstata a diferencia del tejido normal, lo que sugiere su activación en cáncer y que con ello se genera la transcripción de genes diana involucrados en diversos procesos patológicos de la enfermedad (Lessard et al., 2005). Por otra parte, se ha observado que NF-κB p52 se ha relacionado con la generación de resistencia a fármacos anti androgénicos en líneas celulares de cáncer de próstata resistente a la castración (Nadiminty et al., 2013). Con respecto a esto, investigadores han demostrado que existe una alta expresión de NF-κB p52 en las líneas celulares de CaP LNCaP, C4-2B y CWR22RV1 lo que generaría resistencia a enzalutamida por aumento de variantes de empalme del receptor de andrógenos. También, se observó que la disminución de la expresión de p52 en estas células, disminuye considerablemente la expresión de las variantes de empalme de AR, lo que reafirma el papel de p52 en la resistencia a fármacos en estas líneas (Nadiminty et al., 2013). Aparte, se observó que cuando se inhibía la expresión de p52 en estas células, aumentaba la sensibilidad al fármaco con

respecto a los controles que expresaban p52. En concordancia con estos resultados previos, y con los resultados obtenidos por nuestra investigación, podemos postular que oxLDL es capaz de aumentar la expresión de NF- κ B p52 en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B. Creemos en base a esto que, al igual que lo expuesto en el resultado anterior, este fenómeno podría estar involucrado en la generación de resistencia a taxanos en CRPC.

c. La oxLDL induce la expresión del marcador de resistencia MDR1 en las líneas celulares de CRPC C4-2B, DU145 y 22RV1.

El análisis de expresión de la proteína de resistencia a múltiples drogas (MDR1) ha mostrado que existe un aumento de la expresión de MDR1 en las líneas celulares de cáncer de próstata 22RV1, DU145 y C4-2B.

La farmacorresistencia puede darse tanto de forma intrínseca, es decir, antes de cualquier tratamiento, o adquirida, desarrollándose después de la respuesta inicial al tratamiento (Turner & Reis-Filho, 2012). La multirresistencia a drogas se ha convertido en uno de los principales problemas para el éxito de la terapia contra el cáncer, y en este contexto es que se han identificado diversos mecanismos involucrados en este fenómeno. Se ha determinado que el mecanismo predominante de la quimiorresistencia está dado por el aumento en el flujo de salida de las drogas en las células cancerígenas. Esto está dado por la acción de la glicoproteína P, también llamada P-gp, ABCB1 o MDR1 (H. Zhang

et al., 2021). MDR1 es un transportador dependiente de ATP y cataliza la translocación de numerosos medicamentos contra el cáncer, incluidos los taxanos. (Jones & George, 2004). Fisiológicamente, MDR1 se expresa en diversos tejidos tales como el intestino, el colon, la placenta, el hígado y la barrera hematoencefálica, en donde cumple un rol protector al evitar que moléculas xenobióticas se acumulen en órganos sensibles como estos. También, se han descrito funciones secretoras para MDR1 ya que está relacionada con la liberación de hormonas esteroideas y corticoides. (Bossennec et al., 2018), sin embargo, también se conoce que MDR1 es responsable de fenómenos de resistencia en la terapia del cáncer.

La sobreexpresión de MDR1 se ha observado en diversos tipos de cáncer. En líneas celulares de carcinoma de mama resistente a la Doxorrubicina hay una sobreexpresión de la proteína, e interesantemente, el aumento de la expresión es dependiente de la regulación al alza de la señalización de NF- κ B, lo que contribuye a la resistencia a estos fármacos.(Feng et al., 2021). También, se ha observado la sobreexpresión de MDR1 en el cáncer de mama triple negativo, asociándose a este hallazgo la resistencia a fármacos y a la propagación metastásica del cáncer (Nedeljković et al., 2021).

En el cáncer de pulmón de células no pequeñas, se ha demostrado que MDR1 está altamente expresado tanto en líneas celulares como en tejidos de pacientes con la enfermedad, y ello está involucrado en la regulación del crecimiento celular

y la apoptosis. También, se asoció a esto la resistencia al cisplatino presentada en los pacientes tratados con esta droga para la enfermedad. (Tian et al., 2020).

Con respecto al CaP, algunos estudios han demostrado previamente que en líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y C4-2B, la sobreexpresión de MDR1 confiere resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel, e incluso, que otros genes adicionales encontrados en el “amplicon” MDR1 podrían contribuir a la resistencia potenciando este efecto junto a MDR1 (Lombard et al., 2021). Resulta interesante investigar si en estas líneas celulares estos genes también son sobre expresados cuando las células son tratadas con oxLDL.

Por otra parte, investigadores han demostrado que la vía NF- κ B está relacionada también con la sobreexpresión de MDR1 en células de cáncer de pulmón, en donde se demostró que el tratamiento con hespertina sensibiliza a las células de cáncer de pulmón al cisplatino por la disminución de la expresión de NF- κ B p-65 y su traslocación nuclear, con la consiguiente disminución de la expresión de MDR1 (Kong et al., 2020). Esto respalda a nuestros resultados, en donde pudimos ver un aumento de la expresión de MDR1 en las líneas celulares trabajadas y que podría relacionarse con un aumento en la expresión de NF- κ B p65.

d. La oxLDL induce la expresión del marcador de resistencia TUBB3 en las líneas celulares de CRPC 22RV1, DU145 y C4-2B.

Nuestros resultados demuestran que la oxLDL promueve la sobreexpresión de la isoforma TUBB3 en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B comparados con el control sin tratamiento.

Los microtúbulos son estructuras del citoesqueleto que cumplen un papel importante en diversos eventos celulares y son esenciales en el proceso de división celular, por lo que son un blanco de tratamiento atractivo para el diseño de fármacos contra el cáncer (Kavallaris, 2010a). La isoforma de β -tubulina, la TUBB3, se encuentra principalmente en neuronas y células testiculares de Sertoli, sin embargo, se han encontrado también niveles elevados en varios tipos de tumores en comparación con el tejido normal, esto asociado con una enfermedad agresiva e invasiva y resistente a drogas (Kavallaris, 2010a). Por ejemplo, en el cáncer de endometrio se ha demostrado que existe la expresión de TUBB3, debido a la disminución de la expresión del micro ARN miR-200c, quién es un regulador negativo de su expresión. Sin embargo, cuando se restaura la expresión de miR-200c, los niveles de TUBB3 descienden y la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos de unión a tubulina recobran su acción citotóxica (Cochrane et al., 2009). Investigaciones han demostrado que, en melanoma, la sobreexpresión de TUBB3 en líneas celulares de la enfermedad genera resistencia Docetaxel, y el efecto citotóxico del fármaco se ha recuperado cuando

se silenció el gen de TUBB3, disminuyendo su expresión. Lo anterior sugiere que, para generar la resistencia en estas células, es necesaria una mayor incorporación de TUBB3 en la red microtubular en células de melanoma resistentes a Docetaxel (Mhaidat et al., 2008). En sus análisis también demostraron que en las líneas celulares resistentes a Docetaxel, el porcentaje de β -tubulina polimerizada era mucho menor, dando a entender la alta expresión de la isoforma TUBB3 en las células cancerígenas, lo que está implicado en la resistencia a drogas por pérdida del sitio de unión del fármaco a la β tubulina. (Mhaidat et al., 2008). En el cáncer de ovario, se ha observado resistencia a Paclitaxel inducida por la sobreexpresión de la isoforma TUBB3 en el adenocarcinoma de tipo seroso de ovarios, mas no en el cáncer de cuello uterino. (Kavallaris, 2010b). Con respecto al cáncer urotelial también se ha observado un aumento en la expresión de TUBB3, y esto se relaciona directamente con un mal pronóstico de la enfermedad debido a la recurrencia de la patología (Massari et al., 2015). También, se ha visto que en tumores cerebrales como el glioblastoma se encuentra sobreexpresado TUBB3 de forma aberrante en todos los grados de la enfermedad (Katsetos et al., 2009).

En base a estos datos, se propone que la sobreexpresión de la proteína en numerosos tipos de cáncer, podría también ser objeto de estudio como un biomarcador del tipo, severidad y recurrencia de la patología.

En el cáncer de próstata ya se han reportado datos sobre la expresión de TUBB3. Se sabe que en líneas celulares de cáncer de próstata resistentes a Paclitaxel (Ranganathan et al., 1998) y Docetaxel (Ploussard et al., 2010) existe una regulación al alza de TUBB3. También se ha asociado la sobreexpresión de TUBB3 con un alto puntaje de Gleason y un pobre pronóstico de la enfermedad por aumento de la recurrencia de la patología del CaP resistente a Docetaxel. (Ploussard et al., 2010).

Con respecto a las vías de señalización o la forma en que se sobreexpresa TUBB3 no se conoce mucho. Análisis en líneas celulares de cáncer de ovario han demostrado la participación de dos proteínas en la sobreexpresión de TUBB3: GBP1, que es capaz de activar la función pro-supervivencia de forma dependiente de TUBB3, y GNAI1, una proteína inhibitoria de GBP1. Se ha observado que en líneas celulares de cáncer de ovarios existe un aumento de GBP1 mientras que GNAI1 presenta niveles bajos de expresión (de Donato et al., 2012). También, se sabe que la sobreexpresión de TUBB3 está dada como una forma de supervivencia al microambiente tumoral, en donde existen numerosos eventos de estrés como la hipoxia y el bajo suministro de nutrientes, por lo que las vías de señalización que se activan en estas condiciones contribuirían a la generación de resistencia mediada por TUBB3 (Raspaglio et al., 2010).

En cáncer de próstata, se conoce que algunos de los tratamientos, como el Docetaxel, por sí mismo es capaz de activar vías de señalización de

supervivencia como JNK, STAT 1, STAT 3, NF- κ B (Magadoux et al., 2014), pero no se conoce si estas vías también son activadas por estímulos externos como, por ejemplo, la oxLDL y están relacionadas con la resistencia a taxanos dependiente de la expresión de TUBB3. El conocer que el microambiente tumoral activa vías de supervivencia como las mencionadas anteriormente nos hace suponer que, oxLDL al contribuir como un agente de estrés en este contexto, podría inducir la sobreexpresión de TUBB3 aumentando la resistencia a la terapia.

Con respecto a lo último, cabe mencionar que, en análisis *in silico* del promotor de TUBB3 se demostró que este posee un sitio de unión del factor de transcripción NF- κ B, lo que podría relacionar a la activación de la vía de señalización con la sobreexpresión de TUBB3 en el cáncer (Dennis et al., 2002). Coincidentemente, nuestros resultados han mostrado un aumento en la expresión de ambos factores, lo que nos permite postular que oxLDL, a través de la activación de la vía NF- κ B aumenta la expresión de TUBB3 en las líneas celulares de cáncer de próstata 22RV1, DU145 y C4-2B.

e. MDR1 es expresado en la membrana cuando las líneas celulares 22RV1, C4-2B y DU145 son tratadas con oxLDL.

Como se ha mencionado anteriormente en el punto 3, el eflujo de drogas a través de MDR1 se conoce como uno de los principales mecanismos involucrados en la generación de resistencia a drogas tanto en el cáncer como en otras patologías.

Se ha observado que MDR1 influye en la respuesta a las drogas anticancerígenas, inhibidores de proteasas para el tratamiento del VIH, agentes antimicrobianos, esteroides, drogas cardíacas, antihistamínicos, opioides inmunosupresores, entre otros (Bossennec et al., 2018), lo que convierte a esta proteína en un blanco de interés en el tratamiento del cáncer.

Uno de los factores que es capaz de inducir la expresión de MDR1 en el contexto del cáncer es la hipoxia a través del factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α). Este factor es capaz de unirse al promotor de ABCB1 y es capaz de activar la transcripción del gen (Comerford et al., 2004). Los niveles de glucosa y el estrés oxidativo son otros de los factores que promueven la expresión de MDR1 (Bossennec et al., 2018). Considerando que los experimentos fueron realizados en líneas celulares de cáncer de próstata resistente a la castración, alguno de estos factores podría estar también involucrado en la sobreexpresión del transportador. Con respecto al estrés oxidativo y la activación de NF- κ B inducida por este efecto, sería interesante complementar nuestros hallazgos analizando si oxLDL, que se ha reportado es un generador de estrés oxidativo en estas líneas celulares, como ha reportado nuestro grupo de investigación anteriormente, puede estar activando la expresión de MDR1 en respuesta al estrés oxidativo celular que este puede causar.

Por otra parte, las caracterizaciones estructurales y funcionales de MDR1 sugieren que la funcionalidad de MDR1 es dependiente de las proteínas kinasas

A (Wojtal et al., 2006) y proteína kinasa C (Chambers et al., 1994). También se ha visto que la localización preferencial de MDR1 es en la membrana apical de la célula, específicamente en balsas lipídicas de la membrana plasmática. También el colesterol es importante en la funcionalidad de MDR1 en la membrana y se ha observado que, si este disminuye, la capacidad de eflujo de MDR1 se ve reducida (Troost et al., 2004a).

Resulta interesante observar en los resultados obtenidos que la co-localización receptor-membrana si bien es observada, esta solo ocurre en regiones perimetrales de las células. Considerando que oxLDL es capaz de inducir la sobreexpresión de MDR1, pero no se ha reportado su función en la translocación de MDR1 a la membrana, nuestros resultados no nos permiten determinar exactamente si existe una expresión hacia las regiones apicales de la célula como se ha reportado, ya que las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia no permiten la determinación de estos detalles. Para ello, es necesario realizar mediante microscopía confocal un análisis de *z-stack* que nos permitiría analizar si efectivamente existe una expresión de receptores ante el estímulo producido por oxLDL.

También es interesante conocer el efecto sinérgico entre oxLDL y los taxanos Docetaxel y Cabazitaxel aumentan aún más la expresión de MDR1 en la membrana, ya que se ha reportado que estas moléculas son capaces de activar por sí solos vías de supervivencia celular (Magadoux et al., 2014) que podrían

estar involucradas en la resistencia a drogas y dilucidar si una mayor localización del receptor en la membrana para el eflujo de drogas puede estar mediado en mayor medida por ellas. También sería interesante conocer el efecto que tiene oxLDL en la funcionalidad de MDR1, considerando que el colesterol se ha asociado con la eficiencia en la eflujo de drogas por parte del transportador (Troost et al., 2004b). Debido a que la oxLDL es una lipoproteína modificada a nivel de colesterol y a nivel proteico, esto podría conceder determinadas características en este contexto.

f. La oxLDL aumenta la sobrevida celular de 22RV1, DU145 y C4-2B cuando las líneas celulares son tratadas con Docetaxel y Cabazitaxel.

Nuestros resultados muestran que la oxLDL aumenta la sobrevida celular de 22RV1 y C4-2B frente a los tratamientos con Docetaxel y Cabazitaxel, no así en la línea celular DU145.

Docetaxel es un taxano de segunda generación utilizado en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración. Aunque los pacientes en tratamiento con el fármaco presentan una respuesta favorable al inicio de la terapia, esta se ve limitada a un periodo corto de tiempo (Chandrasekar et al., 2015a), generando lo que se conoce como un cáncer de próstata resistente a la castración resistente a Docetaxel. En respuesta a este problema es que se aprueba en el año 2010 el fármaco Cabazitaxel, que es un derivado semi sintético de Docetaxel, con el que se trata el CRPC resistente a Docetaxel (Hongo et al.,

2018). Lamentablemente, los pacientes tratados con Cabazitaxel generarán resistencia a esta droga transcurrido un tiempo de iniciada la terapia. Es por esto por lo que es importante el estudio de la resistencia a taxanos en el tratamiento en el CRPC y conocer cuáles son los factores que influyen o son mediadores de este fenómeno.

Los mecanismos descritos para la resistencia a taxanos en el cáncer de próstata resistente a la castración son numerosos. Se conoce que la transición epitelio-mesenquimal (ETM); la producción de citoquinas proinflamatorias y la inflamación, la expresión de las variantes de empalme del receptor de andrógenos, el fenotipo de multirresistencia a drogas (MDR); y las alteraciones en la β -tubulina, como la expresión de la isoforma TUBB3, son los principales mecanismos asociados a este fenómeno (Galletti et al., 2017).

Nuestros resultados muestran que en las líneas celulares de CRPC, DU145, 22RV1 y C4-2B, la oxLDL genera una respuesta al alza en la expresión de TUBB3 y MDR1, posiblemente regulada por la activación de la vía NF- κ B, por lo que es posible proponer que estos mecanismos son los que podrían determinar la resistencia observada en los estudios de citotoxicidad en las líneas celulares de CRPC tratadas con oxLDL y taxanos. Sin embargo, esta hipótesis podría responder a lo observado en las líneas celulares C4-2B y 22RV1, mas no a lo que se observó para DU145 en donde si bien la expresión de TUBB3 y MDR1 están incrementados, no se observan cambios significativos en la sobrevivencia de

esta línea celular. Con respecto a esto, planteamos que, en la resistencia a taxanos inducida por oxLDL en esta línea celular, puede también estar involucrada la expresión del receptor de andrógenos (AR) o alguna de sus variantes, ya que resulta interesante observar que en las células que expresan AR (22RV1 y C4-2B) (Spans et al., 2014; Sramkoski et al., 1999) se observa un aumento significativo en la sobrevida celular, mientras que para DU145, que no expresa este receptor, los efectos no se observaron de manera significativa.

La resistencia a los fármacos anti androgénicos por acción del receptor de andrógenos ha sido bien documentada, sin embargo, AR no solamente está involucrado en la resistencia a estos antagonistas del receptor de andrógenos, sino que recientemente se ha visto que es capaz de influir en la respuesta de las células de cáncer de próstata a los taxanos. Ya que Docetaxel y Cabazitaxel son capaces de inhibir la señalización del receptor de andrógenos impidiendo su traslocación al núcleo, se refuerza la hipótesis de la importancia del receptor de andrógenos en la resistencia a taxanos mediada por la sobreexpresión de genes de sobrevida a través de AR (Ciccarese et al., 2016).

Las variantes de AR son isoformas del receptor que carecen del dominio de unión a ligando, son constitutivamente activos y son capaces de promover la transcripción de genes diana, en especial los genes de sobrevida en CRPC (Antonarakis et al., 2015). Se ha reportado en algunos estudios que el transporte nuclear del receptor de andrógenos mediado por microtúbulos no es la única vía

de traslocación del receptor al núcleo, y que existen vías adicionales que operan en ausencia de la región bisagra de AR, como en el caso de ARv7, una variante de empalme de AR (Thadani-Mulero et al., 2014)

Por otra parte, se ha observado que el receptor de andrógenos es capaz de activar la vía de señalización NF- κ B en el contexto del CaP. De hecho, un estudio reportó que la activación de la vía NF- κ B y la consecuente activación de AR-v7 están asociados con el aumento de la severidad de la enfermedad y con la resistencia a inhibidores de la α -5-reductasa en la hiperplasia prostática benigna (Austin et al., 2016). También, se ha reportado que AR-V7 genera resistencia a enzalutamida por activación de la vía no canónica de NF- κ B p52 (Nadiminty et al., 2013). En base a que no hay expresión de AR ni de sus variantes en las células DU145 (Giatromanolaki et al., 2019), postulamos que no hay un aumento significativo en la sobrevida de estas células cuando son tratadas con oxLDL y taxanos, lo puede deberse a la ausencia de AR, y que, en el caso de las otras líneas celulares, este receptor esté ejerciendo un efecto mediado por oxLDL en la sobrevida celular. Resultaría interesante analizar el efecto del silenciamiento de AR en C4-2B y 22RV1 para observar la consecuencia de esta modificación en la respuesta a Docetaxel y Cabazitaxel y si puede establecerse que sea un participante importante en la respuesta a taxanos en co-tratamientos con oxLDL en conjunto con los demás factores generadores de resistencia descritos en esta tesis. En los resultados anteriores de nuestro laboratorio se ha demostrado que

oxLDL induce la expresión y función de AR, por lo que la hipótesis anteriormente planteada puede ser sustentadas (Duprat, 2021).

g. Los receptores scavenger para oxLDL LOX-1 y CD36 se encuentran aumentados en tumores primarios de próstata y metástasis en comparación con el tejido prostático normal.

En corolario, con todos los resultados obtenidos durante esta tesis podemos sugerir que oxLDL es capaz de aumentar la sobrevivencia celular en las líneas de cáncer de próstata 22RV1, DU145 y C4-2B, a través de la activación de la vía NF- κ B, la que posiblemente media la sobreexpresión observada de MDR1 y TUBB3. Debido a esto, utilizando la base de datos pública GEO PROFILE se analizó cuáles podrían ser los receptores involucrados en los efectos que genera la oxLDL en células CRPC.

En este contexto, los receptores scavenger se definen como proteínas integrales de membrana presentes en la superficie celular, cuya función es promover la eliminación de sustancias nocivas, por lo que son capaces de interactuar con diversos ligandos (Cuthbert et al., 2020). Se ha documentado que CD36 (Xu et al., 2021), MSR1 (Dai et al., 2013) y LOX-1 (Balzan & Lubrano, 2018b) pueden interactuar con oxLDL. En este contexto es que evaluamos la expresión de estos receptores de lipoproteína de baja densidad oxidada en distintos estadios del CaP, y los comparamos con el receptor de LDL nativa, LDLR (Mineo, 2020).

Nuestros resultados muestran que existe un aumento significativo en la expresión de los receptores CD36 y LOX-1 tanto en los tumores primarios como en metástasis, comparándolos con el tejido prostático normal. En este mismo contexto, MSR1 mantuvo su expresión en los diversos estadios del CaP analizados, por lo que probablemente este receptor no está contribuyendo a los efectos de resistencia observados. Para el receptor de LDL nativa, LDLR, resulta interesante que mientras aumenta la expresión del receptor LOX-1 y CD36, los cuales endocitan lipoproteínas de baja densidad desde mínimamente oxidadas hasta totalmente oxidadas, la expresión de LDLR disminuye. Se conoce que LDLR no es afín con oxLDL debido a las modificaciones estructurales que sufre esta última (Yoshida & Kisugi, 2010) lo que implicaría que este receptor no participa en la resistencia observada en los resultados de esta tesis. De igual manera, se ha reportado que el microambiente tumoral es altamente oxidante, por lo cual la integridad de las lipoproteínas puede verse afectada previo a la interacción con sus receptores, y esto implica que su endocitosis podría estar mediada por receptores scavenger.

Con respecto a CD36, los resultados concuerdan con lo que se ha reportado con anterioridad. En células epidérmicas tumorales de cáncer de ovario, cáncer gástrico, glioblastomas y en carcinoma oral de células escamosas se ha registrado una regulación al alza de este receptor. Por otra parte, se sabe que el promotor del gen de CD36 posee elementos de respuesta al receptor activado por proliferación de peroxisomas (PPAR), por lo que ligandos de PPAR γ , como

la oxLDL promueven la transcripción del mRNA de CD36 (J. Wang & Li, 2019). Se ha observado también que oxLDL, al ser captada por CD36, es capaz de activar PPAR a través de las vías de proteína kinasa C, proteína kinasa B y proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK), generando una mejora en la captación de oxLDL y con ello mejorar la expresión del receptor (J. Wang & Li, 2019). En cáncer gástrico se ha observado que CD36 es regulado al alza por acción de los ácidos grasos mediante la activación de la vía NF- κ B (Jiang et al., 2019), y en el contexto cardiovascular se ha visto que CD36 es regulado al alza por altos niveles de glucosa sanguínea con la consiguiente activación de NF- κ B y el aumento de la inflamación (Han et al., 2021). Como se ha mostrado en estas investigaciones, existe una relación entre CD36 y la vía de señalización NF- κ B, lo que nos permite sugerir que éste podría ser uno de los receptores que está interaccionando con oxLDL y generando los efectos observados en nuestros resultados mediados por la activación de NF- κ B. Resultaría interesante analizar la expresión de este receptor en las líneas celulares 22RV1, DU145 y C4-2B para poder compararlos con los obtenidos desde los datos de bases de datos públicos y reafirmar nuestra hipótesis. También, sería de gran interés conocer el efecto del silenciamiento del receptor CD36 en las líneas celulares para observar la expresión de marcadores de resistencia a taxanos como TUBB3 y MDR1 y si la sobrevivencia celular es disminuida por acción de la regulación a la baja del receptor. Estos resultados nos permitirían obtener fundamentos para afirmar que los

efectos en la supervivencia celular están dados por la interacción CD36, oxLDL y NF- κ B.

Por otra parte, el receptor LOX-1 está sobre expresada tanto en tumores primarios de próstata como en etapas de metástasis. Este receptor ha sido objeto de estudio en nuestro grupo de trabajo, y se ha observado en primer lugar, que existe una sobreexpresión de LOX-1 en los adenocarcinomas prostáticos y que esto se relaciona directamente con un alto puntaje de Gleason en el CaP (González-Chavarría et al., 2018). También se demostró que oxLDL, al interactuar con LOX-1 es capaz de aumentar la expresión de marcadores pro angiogénicos en células C4-2, (González-Chavarría et al., 2014), y que la interacción oxLDL/LOX-1 promueve la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, C4-2 y DU145 determinado por el aumento de vimentina como marcador de EMT (González-Chavarría et al., 2018). También se ha podido determinar que oxLDL y LOX-1 pueden aumentar la expresión de la variante de empalme del receptor de andrógenos, AR-V7, que oxLDL al interactuar con LOX-1 puede inducir resistencia a enzalutamida en células C4-2B, y que oxLDL al interactuar con LOX-1 es capaz de activar la vía de señalización NF- κ B p65 en la línea celular C4-2B y que el silenciamiento del receptor disminuye la expresión de p65 en estas mismas células (Duprat et al., 2021).

Aparte de los resultados expuestos anteriormente, se ha reportado en la literatura el eje de sinergia presente entre oxLDL, LOX-1 y la vía de señalización NF- κ B tanto en el cáncer como en otras patologías. Por ejemplo, se ha observado que, aunque LOX-1 se regula principalmente por ox-LDL, también lo hace por acción de citocinas proinflamatorias, angiotensina II y endotelina. También se ha demostrado que la unión de oxLDL a LOX-1 aumenta la formación de especies reactivas del oxígeno, disminuye la liberación de óxido nítrico, lo que genera la activación de la cascada PI3K/AKT/GSK3 β y esta vía a su vez resulta en el desencadenamiento de factores de transcripción de NF- κ B. También se pueden generar, en este contexto, la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 e IL-1 β , aumentar la activación de vías de hipoxia, la transición epitelio mesenquimal y, en un proceso cíclico, aumentar la expresión del receptor y la consecuente activación de la vía de señalización (Murdocca et al., 2021). Finalmente, se ha demostrado que oxLDL es capaz de inducir la sobreexpresión de VEGF y angiogénesis, lo que está dado por la activación de la vía de señalización NF- κ B a través de LOX-1 (Caiqi et al., 2019).

En base a toda la evidencia expuesta en la literatura, los resultados que se han obtenido en los experimentos de esta tesis y los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación, es que postulamos que los efectos en la supervivencia celular con la consiguiente resistencia a la terapia observada en las líneas celulares de CRPC, podrían estar siendo inducidos por oxLDL y estar mediados a través del LOX-1.

6. CONCLUSIÓN

La hipótesis planteada en esta tesis es que la activación de la vía de señalización NF- κ B por acción de oxLDL, induce la resistencia a Docetaxel y Cabazitaxel mediante la sobreexpresión de MDR1 y TUBB3 en modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración. Con los resultados obtenidos es posible aceptar esta hipótesis y proponer que el eje oxLDL/NF- κ B/MDR1/TUBB3 generan un aumento en la sobrevida celular frente a los tratamientos con los taxanos Docetaxel y Cabazitaxel. De igual manera proponemos que este eje pudiera estar dirigido a través de la activación de los receptores CD36 y LOX-1 los cuales, en otros tipos de cáncer, en el caso de cd36 y particularmente en CaP en el caso de LOX-1, se ha descrito que activan la vía NF- κ B la cual desencadena en parte la resistencia a taxanos. Este estudio permite cimentar las bases para la generación de nuevos blancos terapéuticos en la resistencia como pueden ser los receptores LOX-1 o CD36, la generación de conductas de salud preventivas del cáncer como disminuir las concentraciones de lipoproteínas de baja densidad plasmáticas de pacientes que pueden padecer la enfermedad ya que son estas el sustrato inicial en la generación de oxLDL, entre muchas otros. De esta manera, se podría contribuir a mejorar la sobrevida y la calidad de vida de los pacientes CRPC en las etapas terminales de esta patología.

7. REFERENCIAS

- Adesunloye, B. A. (2021a). Mechanistic Insights into the Link between Obesity and Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS22083935>
- Adesunloye, B. A. (2021b). Mechanistic Insights into the Link between Obesity and Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3935, 22(8), 3935. <https://doi.org/10.3390/IJMS22083935>
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Luber, B., Wang, H., Chen, Y., Nakazawa, M., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A., Eisenberger, M. A., & Luo, J. (2015). Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncology*, 1(5), 582–591. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2015.1341>
- Austin, D. C., Strand, D. W., Love, H. L., Franco, O. E., Jang, A., Grabowska, M. M., Miller, N. L., Hameed, O., Clark, P. E., Fowke, J. H., Matusik, R. J., Jin, R. J., & Hayward, S. W. (2016). NF- κ B and androgen receptor variant expression correlate with human BPH progression. *The Prostate*, 76(5), 491–511. <https://doi.org/10.1002/PROS.23140>
- Balzan, S., & Lubrano, V. (2018a). LOX-1 receptor: A potential link in atherosclerosis and cancer. In *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.024>
- Balzan, S., & Lubrano, V. (2018b). LOX-1 receptor: A potential link in atherosclerosis and cancer. *Life Sciences*, 198, 79–86. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.02.024>
- Bitorina, A. v., Oligschlaeger, Y., Ding, L., Yadati, T., Westheim, A., Houben, T., Vaes, R. D. W., Olde Damink, S. W. M., Theys, J., & Shiri-Sverdlov, R. (2021). OxLDL as an Inducer of a Metabolic Shift in Cancer Cells. *Journal of Cancer*, 12(19), 5817. <https://doi.org/10.7150/JCA.56307>

- Bitorina, A. v., Oligschlaeger, Y., Shiri-Sverdlov, R., & Theys, J. (2019). Low profile high value target: The role of OxLDL in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(12), 158518. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2019.158518>
- Bossennec, M., di Roio, A., Caux, C., & Ménétrier-Caux, C. (2018). MDR1 in immunity: friend or foe? *Oncoimmunology*, 7(12). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1499388>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Caiqi, M. A., Jinye, X. I. E., Chuanghua, L. U. O., Haofan, Y. I. N., Ruopu, L. I., Wang, X., Xiong, W., Zhang, T., Jiang, P., Weiwei, Q. I., Zhou, T., Yang, Z., Wang, W., Jianxing, M. A., Guoquan, G. A. O., & Yang, X. (2019). OxLDL promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in gastric cancer by upregulating VEGF-C expression and secretion. *International Journal of Oncology*, 54(2), 572. <https://doi.org/10.3892/IJO.2018.4648>
- Chambers, T. C., Pohl, J., Glass, D. B., & Kuo, J. F. (1994). Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein. *The Biochemical Journal*, 299 (Pt 1)(Pt 1), 309–315. <https://doi.org/10.1042/BJ2990309>
- Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015a). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology*, 4(3), 365. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2223-4683.2015.05.02>
- Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015b). Targeting molecular resistance in castration-resistant prostate cancer. In *BMC Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0457-6>
- Ciccarese, C., Santoni, M., Brunelli, M., Buti, S., Modena, A., Nabissi, M., Artibani, W., Martignoni, G., Montironi, R., Tortora, G., & Massari, F. (2016). AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection? *Cancer Treatment Reviews*, 43, 27–35. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2015.12.003>
- Cochrane, D. R., Spoelstra, N. S., Howe, E. N., Nordeen, S. K., & Richer, J. K. (2009). MicroRNA-200c Mitigates Invasiveness and Restores Sensitivity to

- Microtubule-Targeting Chemotherapeutic Agents. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(5), 1055. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1046>
- Comerford, K. M., Cummins, E. P., & Taylor, C. T. (n.d.). *c-Jun NH 2-Terminal Kinase Activation Contributes to Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent P-Glycoprotein Expression in Hypoxia*. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/64/24/9057/2521627/zch02404009057.pdf>
- Cuthbert, G. A., Shaik, F., Harrison, M. A., Ponnambalam, S., & Homer-Vanniasinkam, S. (2020). Scavenger Receptors as Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Cells*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/CELLS9112453>
- da Luz, P. L., Chagas, A. C. P., Dourado, P. M. M., & Laurindo, F. R. M. (2018). Endothelium in Atherosclerosis: Plaque Formation and Its Complications. *Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes*, 493–512. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812348-5.00033-7>
- Dai, Y., Su, W., Ding, Z., Wang, X., Mercanti, F., Chen, M., Raina, S., & Mehta, J. L. (2013). Regulation of MSR-1 and CD36 in macrophages by LOX-1 mediated through PPAR- γ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(3), 496–500. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.01.029>
- de Donato, M., Mariani, M., Petrella, L., Martinelli, E., Zannoni, G. F., Vellone, V., Ferrandina, G., Shahabi, S., Scambia, G., & Ferlini, C. (2012). Class III β -tubulin and the cytoskeletal gateway for drug resistance in ovarian cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 227(3), 1034–1041. <https://doi.org/10.1002/JCP.22813>
- de Leeuw, R., Berman-Booty, L. D., Schiewer, M. J., Ciment, S. J., Den, R. B., Dicker, A. P., Kelly, W. K., Trabulsi, E. J., Lallas, C. D., Gomella, L. G., & Knudsen, K. E. (2015). Novel actions of next-generation taxanes benefit advanced stages of prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1358>
- de Morrée, E. S., Böttcher, R., van Soest, R. J., Aghai, A., de Ridder, C. M., Gibson, A. A., Mathijssen, R. H. J., Burger, H., Wiemer, E. A. C., Sparreboom, A., de Wit, R., & van Weerden, W. M. (2016). Loss of SLCO1B3 drives taxane resistance in prostate cancer. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.251>

- Dejardin, E., Rie Deregowski, V., Greimers, R., Cai, Z., Chouaib, S., Merville, M.-P., & Bours, V. (1998). *Regulation of major histocompatibility complex class I expression by NF- κ B-related proteins in breast cancer cells*. <http://www.stockton-press.co.uk/onc>
- Dennis, K., Uittenbogaard, M., Chiaramello, A., & Moody, S. A. (2002). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III beta-tubulin gene. *Gene*, 294(1–2), 269–277. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00801-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00801-6)
- Diakowska, D., Grabowski, K., Nienartowicz, M., Zarębski, P., Fudalej, K., & Markocka-Mączka, K. (2015). Circulating oxidized low-density lipoproteins and antibodies against oxidized low-density lipoproteins as potential biomarkers of colorectal cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/146819>
- Duprat, F. D. (2021). Efecto de dihidromiricetina y quercetina en la prevención de la resistencia a enzalutamida inducida por lox-1/oxldl en células de cáncer de próstata resistente a castración. In *Universidad de Concepción*. <http://repositorio.udec.cl/handle/11594/9089>
- Duran, G. E., Wang, Y. C., Brian Francisco, E., Rose, J. C., Martinez, F. J., Coller, J., Brassard, D., Vrignaud, P., & Sikic, B. I. (2015). Mechanisms of Resistance to Cabazitaxel. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(1), 193. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0155>
- Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G., & Gélinas, C. (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene* 2006 25:51, 25(51), 6800–6816. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209938>
- Fabbri, F., Amadori, D., Carloni, S., Brigliadori, G., Tesei, A., Ulivi, P., Rosetti, M., Vannini, I., Arienti, C., Zoli, W., & Silvestrini, R. (2008). Mitotic catastrophe and apoptosis induced by docetaxel in hormone-refractory prostate cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.21522>
- Feng, J., Peng, Z., Gao, L., Yang, X., Sun, Z., Hou, X., Li, E., Zhu, L., & Yang, H. (2021). CIC-3 promotes paclitaxel resistance via modulating tubulins polymerization in ovarian cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, 111407. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111407>

- Galletti, G., Leach, B. I., Lam, L., & Tagawa, S. T. (2017). Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 57, 16–27. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2017.04.008>
- Gan, L., Wang, J., Xu, H., & Yang, X. (2011). Resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate cancer cells by p38/p53/p21 signaling. *Prostate*. <https://doi.org/10.1002/pros.21331>
- Giatromanolaki, A., Fasoulaki, V., Kalamida, D., Mitrakas, A., Kakouratos, C., Lialiaris, T., & Koukourakis, M. I. (2019). CYP17A1 and Androgen-Receptor Expression in Prostate Carcinoma Tissues and Cancer Cell Lines. *Current Urology*, 13(3), 157. <https://doi.org/10.1159/000499276>
- González-Chavarría, I., Cerro, R. P., Parra, N. P., Sandoval, F. A., Zuñiga, F. A., Omazábal, V. A., Lamperti, L. I., Jiménez, S. P., Fernandez, E. A., Gutiérrez, N. A., Rodriguez, F. S., Onate, S. A., Sánchez, 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0106219>
- González-Chavarría, I., Fernandez, E., Gutierrez, N., González-Horta, E. E., Sandoval, F., Cifuentes, P., Castillo, C., Cerro, R., Sanchez, O., & Toledo, J. R. (2018). LOX-1 activation by oxLDL triggers an epithelial mesenchymal transition and promotes tumorigenic potential in prostate cancer cells. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.035>
- Han, B., Wang, J., Wu, J., Yan, F., Wang, Y., & Li, J. (2021). High glucose-induced upregulation of CD36 promotes inflammation stress via NF-κB in H9c2 cells. *Molecular Medicine Reports*, 24(5). <https://doi.org/10.3892/MMR.2021.12404>
- Hayden, M. S., West, A. P., & Ghosh, S. (2006). NF-κB and the immune response. *Oncogene* 2006 25:51, 25(51), 6758–6780. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209943>
- Hongo, H., Kosaka, T., & Oya, M. (2018). Analysis of cabazitaxel-resistant mechanism in human castration-resistant prostate cancer. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/cas.13729>
- Hsing, A. W., Sakoda, L. C., & Chua, S. C. (2007). Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(3), 843S–857S. <https://doi.org/10.1093/AJCN/86.3.843S>

- Humphrey, P. A. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. In *Modern Pathology*. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800054>
- Jain, G., Cronauer, M. v., Schrader, M., Möller, P., & Marienfeld, R. B. (2012). NF- κ B signaling in prostate cancer: A promising therapeutic target? *World Journal of Urology*, 30(3), 303–310. <https://doi.org/10.1007/S00345-011-0792-Y/FIGURES/2>
- Jiang, M., Wu, N., Xu, B., Chu, Y., Li, X., Su, S., Chen, D., Li, W., Shi, Y., Gao, X., Zhang, H., Zhang, Z., Du, W., Nie, Y., Liang, J., & Fan, D. (2019). Fatty acid-induced CD36 expression via O-GlcNAcylation drives gastric cancer metastasis. *Theranostics*, 9(18), 5359–5373. <https://doi.org/10.7150/THNO.34024>
- Jones, P. M., & George, A. M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2004 61:6, 61(6), 682–699. <https://doi.org/10.1007/S00018-003-3336-9>
- Kaiser, A., Haskins, C., Siddiqui, M. M., Hussain, A., & D'Adamo, C. (2019). The Evolving Role of Diet in Prostate Cancer Risk and Progression. *Current Opinion in Oncology*, 31(3), 222. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000519>
- Katsetos, C. D., Dráberová, E., Legido, A., Dumontet, C., & Dráber, P. (2009). Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III beta-tubulin. *Journal of Cellular Physiology*, 221(3), 505–513. <https://doi.org/10.1002/JCP.21870>
- Kattoor, A. J., Goel, A., & Mehta, J. L. (2019). LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis. *Antioxidants*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8070218>
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(11), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S11883-017-0678-6/TABLES/1>
- Kavallaris, M. (2010a). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer* 2010 10:3, 10(3), 194–204. <https://doi.org/10.1038/nrc2803>
- Kavallaris, M. (2010b). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer* 2010 10:3, 10(3), 194–204. <https://doi.org/10.1038/nrc2803>

- Kong, W., Ling, X., Chen, Y., Wu, X., Zhao, Z., Wang, W., Wang, S., Lai, G., & Yu, Z. (2020). Hesperetin reverses P-glycoprotein-mediated cisplatin resistance in DDP-resistant human lung cancer cells via modulation of the nuclear factor- κ B signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 45(4), 1213–1224. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2020.4485/HTML>
- Kroon, J., Kooijman, S., Cho, N. J., Storm, G., & van der Pluijm, G. (2016). Improving Taxane-Based Chemotherapy in Castration-Resistant Prostate Cancer. In *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.03.003>
- Kroon, P., Berry, P. A., Stower, M. J., Rodrigues, G., Mann, V. M., Simms, M., Bhasin, D., Chettiar, S., Li, C., Li, P. K., Maitland, N. J., & Collins, A. T. (2013). JAK-STAT blockade inhibits tumor initiation and clonogenic recovery of prostate cancer stem-like cells. *Cancer Research*, 73(16), 5288–5298. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0874>
- Laisupasin, P., Thompat, W., Sukarayodhin, S., Sornprom, A., & Sudjaroen, Y. (2020). Comparison of Serum Lipid Profiles between Normal Controls and Breast Cancer Patients. *Journal of Laboratory Physicians*, 5(01), 38–41. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.115934>
- Lessard, L., Bégin, L., Gleave, M., Mes-Masson, A., & Saad, F. (2005). Nuclear localisation of nuclear factor-kappaB transcription factors in prostate cancer: an immunohistochemical study. *British Journal of Cancer*, 93, 1019–1023. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602796>
- Li, Z., Xuan, Z., Chen, J., Song, W., Zhang, S., Jin, C., Zhou, M., Zheng, S., & Song, P. (2020). Inhibiting the NF- κ B pathway enhances the antitumor effect of cabazitaxel by downregulating Bcl-2 in pancreatic cancer. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5053>
- Lombard, A. P., Liu, C., Armstrong, C. M., Cucchiara, V., Gu, X., Lou, W., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2017). ABCB1 mediates cabazitaxel–docetaxel cross-resistance in advanced prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0179>
- Lombard, A. P., Lou, W., Armstrong, C. M., D'Abronzio, L. S., Ning, S., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2021). Activation of the ABCB1 Amplicon in Docetaxel- And Cabazitaxel-Resistant Prostate Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(10), 2061–2070. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0983/673399/AM/ACTIVATION-OF-THE-ABCB1-AMPLICON-PROMOTES-CELLULAR>

- Magadoux, L., Isambert, N., Plenchette, S., Jeannin, J. F., & Laurens, V. (2014). Emerging targets to monitor and overcome docetaxel resistance in castration resistant prostate cancer (review). In *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2517>
- Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., & Weisgraber, K. H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal Lipid Research*, 25, 1277–1294. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34443-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34443-6)
- Massari, F., Bria, E., Ciccarese, C., Munari, E., Modena, A., Zambonin, V., Sperduti, I., Artibani, W., Cheng, L., Martignoni, G., Tortora, G., & Brunelli, M. (2015). Prognostic Value of Beta-Tubulin-3 and c-Myc in Muscle Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127908>
- Mercurio, F., & Manning, A. M. (1999). NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 1999 18:45, 18(45), 6163–6171. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203174>
- Mhaidat, N. M., Thorne, R. F., de Bock, C. E., Zhang, X. D., & Hersey, P. (2008). Melanoma cell sensitivity to Docetaxel-induced apoptosis is determined by class III β -tubulin levels. *FEBS Letters*, 582(2), 267–272. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.12.014>
- Mineo, C. (2020). Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 116(7), 1254–1274. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVZ338>
- Ministerio de Salud de Chile., S. de S. Pública. D. de P. y C. de Enfermedades. D. M. I. de C. (2015). Guía clínica AUGÉ: cáncer de próstata en personas de 15 años y más. *Biblioteca Ministerio de Salud*, 103. <http://172.16.1.100:8080/xmlui/handle/2015/533>
- Murdocca, M., de Masi, C., Pucci, S., Mango, R., Novelli, G., di Natale, C., & Sangiuolo, F. (2021). LOX-1 and cancer: an indissoluble liaison. *Cancer Gene Therapy*, 28(10–11), 1088. <https://doi.org/10.1038/S41417-020-00279-0>
- Nadiminty, N., Dutt, S., Tepper, C., & Gao, A. C. (2010). Microarray analysis reveals potential target genes of NF- κ B2/p52 in LNCaP prostate cancer cells. *The Prostate*, 70(3), 276–287. <https://doi.org/10.1002/PROS.21062>
- Nadiminty, N., Tummala, R., Liu, C., Yang, J., Lou, W., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2013). NF- κ B2/p52 Induces Resistance to Enzalutamide in Prostate

- Cancer: Role of Androgen Receptor and Its Variants. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(8), 1629. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0027>
- Nair, A., Venkatraman, M., Maliekal, T., Oncogene, B. N., & 2003, undefined. (n.d.). NF- κ B is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Nature.Com*. Retrieved March 17, 2022, from <https://www.nature.com/articles/1206043>
- Nedeljković, M., Tanić, N., Prvanović, M., Milovanović, Z., & Tanić, N. (2021). Friend or foe: ABCG2, ABCC1 and ABCB1 expression in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*, 28(3), 727–736. <https://doi.org/10.1007/S12282-020-01210-Z/FIGURES/4>
- Ojima, I., Lichtenthal, B., Lee, S., Wang, C., & Wang, X. (2016). Taxane anticancer agents: a patent perspective. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(1), 1. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1111872>
- O'Neill, A. J., Prencipe, M., Dowling, C., Fan, Y., Mulrane, L., Gallagher, W. M., O'Connor, D., O'Connor, R., Devery, A., Corcoran, C., Rani, S., O'Driscoll, L., Fitzpatrick, J. M., & Watson, R. W. G. (2011). Characterisation and manipulation of docetaxel resistant prostate cancer cell lines. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-126>
- Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., & Santanam, N. (2010). Oxidized low-density lipoprotein. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8_24
- Patterson, S. G., Wei, S., Chen, X., Sallman, D. A., Gilvary, D. L., Zhong, B., Pow-Sang, J., Yeatman, T., & Djeu, J. Y. (2006). Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209632>
- Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., & Mucci, L. A. (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. In *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030361>
- Piché, M. E., Tchernof, A., & Després, J. P. (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, 1477–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>
- Pirillo, A., Norata, G. D., & Catapano, A. L. (2013). LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. In *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2013/152786>

- Ploussard, G., Terry, S., Maillé, P., Allory, Y., Sirab, N., Kheuang, L., Soyeux, P., Nicolaiew, N., Coppolani, E., Paule, B., Salomon, L., Culine, S., Buttyan, R., Vacherot, F., & de La Taille, A. (2010). Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. *Cancer Research*, 70(22), 9253. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1447>
- Ranganathan, S., Benetatos, C. A., Colarusso, P. J., Dexter, D. W., & Hudes, G. R. (1998). Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 77(4), 562. <https://doi.org/10.1038/BJC.1998.91>
- Raspaglio, G., de Maria, I., Filippetti, F., Martinelli, E., Zannoni, G. F., Prislei, S., Ferrandina, G., Shahabi, S., Scambia, G., & Ferlini, C. (2010). HuR regulates beta-tubulin isotype expression in ovarian cancer. *Cancer Research*, 70(14), 5891–5900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4656>
- Rayet, B., Oncogene, C. G.-, & 1999, undefined. (n.d.). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Nature.Com*. Retrieved March 17, 2022, from <https://www.nature.com/articles/1203221>
- Reis, R. B. dos, Alías-Melgar, A., Martínez-Cornelio, A., Neciosup, S. P., Sade, J. P., Santos, M., & Villoldo, G. M. (2020). Prostate Cancer in Latin America: Challenges and Recommendations. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 27(1). <https://doi.org/10.1177/1073274820915720>
- Rice, K. R., Koch, M. O., Cheng, L., & Masterson, T. A. (2012). Dyslipidemia, statins and prostate cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(7), 981–990. <https://doi.org/10.1586/ERA.12.75>
- Rosen, R. D., & Sapra, A. (2022). TNM Classification. *StatPearls NCBI*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>
- Schweizer, M., & Antonarakis, E. S. (2014). Chemotherapy and its evolving role in the management of advanced prostate cancer. In *Asian Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122593>
- Shore, N. D., Morgans, A. K., & Ryan, C. J. (2021). Resetting the Bar of Castration Resistance - Understanding Androgen Dynamics in Therapy Resistance and Treatment Choice in Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, 19(3), 199–207. <https://doi.org/10.1016/J.CLGC.2020.08.008>

- Sissung, T. M., Baum, C. E., Deeken, J., Price, D. K., Aragon-Ching, J., Steinberg, S. M., Dahut, W., Sparreboom, A., & Figg, W. D. (2008). ABCB1 genetic variation influences the toxicity and clinical outcome of patients with androgen-independent prostate cancer treated with docetaxel. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4230>
- Spans, L., Helsen, C., Clinckemalie, L., van den Broeck, T., Prekovic, S., Joniau, S., Lerut, E., & Claessens, F. (2014). Comparative Genomic and Transcriptomic Analyses of LNCaP and C4-2B Prostate Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*, 9(2), 90002. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090002>
- Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G., Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., Sy, M. S., Marengo, S. R., Rhim, J. S., Zhang, D., & Jacobberger, J. W. (1999). A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 35(7), 403–409. <https://doi.org/10.1007/S11626-999-0115-4>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Terry, S., Ploussard, G., Allory, Y., Nicolaiew, N., Boissière-Michot, F., Maillé, P., Kheuang, L., Coppolani, E., Ali, A., Bibeau, F., Culine, S., Buttyan, R., de La Taille, A., & Vacherot, F. (2009). Increased expression of class III β -tubulin in castration-resistant human prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 101(6), 951. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6605245>
- Thadani-Mulero, M., Portella, L., Sun, S., Sung, M., Matov, A., Vessella, R. L., Corey, E., Nanus, D. M., Plymate, S. R., & Giannakakou, P. (2014). Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer. *Cancer Research*, 74(8), 2270–2282. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2876>
- Tian, R., Zhang, C., Xiong, F., & Chen, H. (2020). PCAT1/miR-129/ABCB1 axis confers chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 25(5), 948–960. <https://doi.org/10.2741/4842/4842/FIG1.JPG>
- Troost, J., Lindenmaier, H., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2004a). Modulation of Cellular Cholesterol Alters P-Glycoprotein Activity in Multidrug-Resistant

- Cells. *Molecular Pharmacology*, 66(5), 1332–1339.
<https://doi.org/10.1124/MOL.104.002329>
- Troost, J., Lindenmaier, H., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2004b). Modulation of Cellular Cholesterol Alters P-Glycoprotein Activity in Multidrug-Resistant Cells. *Molecular Pharmacology*, 66(5), 1332–1339.
<https://doi.org/10.1124/MOL.104.002329>
- Turner, N. C., & Reis-Filho, J. S. (2012). Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *The Lancet Oncology*, 13(4), e178–e185.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70335-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70335-7)
- Vrignaud, P., Semiond, D., Benning, V., Beys, E., Bouchard, H., & Gupta, S. (2014). Preclinical profile of cabazitaxel. *Drug Design, Development and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S64940>
- Wan, F., Qin, X., Zhang, G., Lu, X., Zhu, Y., Zhang, H., Dai, B., Shi, G., & Ye, D. (2015). Oxidized low-density lipoprotein is associated with advanced-stage prostate cancer. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2994-6>
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & Depinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. In *Genes and Development*.
<https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
- Wang, J., & Li, Y. (2019). CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. *Theranostics*, 9(17), 4893. <https://doi.org/10.7150/THNO.36037>
- Wilson, R. L., Taaffe, D. R., Newton, R. U., Hart, N. H., Lyons-Wall, P., & Galvão, D. A. (2022). Obesity and prostate cancer: A narrative review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 169, 103543.
<https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2021.103543>
- Wojtal, K. A., de Vries, E., Hoekstra, D., & van Ijzendoorn, S. C. D. (2006). Efficient Trafficking of MDR1/P-Glycoprotein to Apical Canalicular Plasma Membranes in HepG2 Cells Requires PKA-R11α Anchoring and Glucosylceramide. *Molecular Biology of the Cell*, 17(8), 3638.
<https://doi.org/10.1091/MBC.E06-03-0230>
- Wong, Y. C., Wang, X. H., & Ling, M. T. (2003). Prostate development and carcinogenesis. *International Review of Cytology*, 227, 65–130.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(03\)01008-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(03)01008-8)
- Xu, S., Chaudhary, O., Rodríguez-Morales, P., Sun, X., Chen, D., Zappasodi, R., Xu, Z., Pinto, A. F. M., Williams, A., Schulze, I., Farsakoglu, Y., Varanasi, S. K., Low, J. S., Tang, W., Wang, H., McDonald, B., Tripple, V., Downes, M.,

- Evans, R. M., ... Kaech, S. M. (2021). Uptake of oxidized lipids by the scavenger receptor CD36 promotes lipid peroxidation and dysfunction in CD8 + T cells in tumors. *Immunity*, 54(7), 1561-1577.e7. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2021.05.003>
- Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 411(23–24), 1875–1882. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2010.08.038>
- Yvan-Charvet, L., Welch, C., Pagler, T. A., Ranalletta, M., Lamkanfi, M., Han, S., Ishibashi, M., Li, R., Wang, N., & Tall, A. R. (2008). Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation*, 118(18), 1837–1847. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.793869>
- Zhang, H., Xu, H., Ashby, C. R., Assaraf, Y. G., Chen, Z. S., & Liu, H. M. (2021). Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp). *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 525–555. <https://doi.org/10.1002/MED.21739>
- Zhang, L., Shao, L., Creighton, C. J., Zhang, Y., Xin, L., Ittmann, M., & Wang, J. (2015). Function of phosphorylation of NF-κB p65 ser536 in prostate cancer oncogenesis. *Oncotarget*, 6(8), 6281. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3366>
- Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., Tang, D., & Chen, R. (2018). Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/BIOM8030080>