



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM, JURIQUILLA, QRO.
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“ ANÁLISIS DEL MECANISMO
PROTECTOR DEL YODO EN EL CÁNCER
MAMARIO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M en C. Omar Elind Arroyo Helguera

DIRECTOR DE TESIS

DRA. CARMEN Y. ACEVES VELASCO

UNAM-INB., Querétaro, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

En este mundo no perdemos el tiempo mirando hacia atrás, vamos al frente, abriendo nuevas veredas y probando nuevas ideas. Somos curiosos..... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce a innovar y a descubrir. Y de nuestros descubrimientos nos maravillamos.

Dnileramo Eneri

DEDICATORIA

A mi esposa Irene

A mis hijos Omar y Arely

A mis padres, Eulalia Helguera y Rubén Arroyo

A mis hermanos, Edgar, Israel, Orlando y Jazmín

A mis suegros Laura Rosas y Felipe Xochihua

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme acogido en su regazo y atestarme de riquezas intelectuales para continuar mi formación profesional.

En la realización de los estudios que componen esta tesis doctoral han sido innumerables las personas que, de un modo u otro, han contribuido a que ésta pudiera llegar a buen fin. A todos ellos les estoy sinceramente agradecido, pero quisiera personalizar mi agradecimiento a algunas personas que me han ayudado de forma especial.

A mi jefa la Dra. Carmen Aceves Velasco, directora de esta tesis, a quien le agradezco su contagioso entusiasmo en la investigación internacional, quien fue fundamental para poner en marcha estos estudios, y el haber creado las condiciones necesarias en el laboratorio para poder llevarlos a cabo. Le agradezco la oportunidad que me dio para cometer mi tesis en un tema tan interesante y henchido de posibilidades. También por el tiempo que dedicó en mi formación académica y científica, por sus consejos, su amistad y sobre todo su confianza y apoyo incondicional.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Aaulfo Martínez y el Dr. Emilio Rojas del castillo por su incesante estímulo académico, científico, por todas sus sugerencias y aportaciones a mi trabajo de tesis durante estos tres años. Al Dr. Emilio le agradezco las estancias en su laboratorio que permitieron fortalecer este trabajo de tesis.

A la Dra. Brenda Anguiano por haberme brindado su amistad. También le agradezco sus valiosos comentarios y críticas a este trabajo durante estos años de formación académica.

A los miembros del jurado: Dra. Carmen Mejía Vázquez, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. María de la Luz Navarro, Dra. Laura Escobar Pérez, Dr. Mariano Martínez Vázquez. Gracias por todas sus aportaciones y acertados comentarios que enriquecieron este trabajo de investigación.

Agradezco al Químico Aurelio Rodríguez Hernández, al Dr. Manuel Aguilar y al Dr. Guillermo Juvenal por su valiosa ayuda en la síntesis y determinación de la 6-yodo-delta-lactona en glándula mamaria de rata.

Agradezco la asesoría técnica de las siguientes personas y Unidades de Apoyo Académico del Instituto de Neurobiología, a la QFB. Guadalupe Delgado y al pasante de

Biología Felipe Ortíz Cornejo; a la Ing. Elsa Nydia Hernández (Unidad de análisis de Imágenes Digitales); al M.V.Z. Martín García Servín (Bioterio); a la Lic. Lourdes Lara (Unidad de Videoconferencia); a la Bib. Pilar Galarza (Biblioteca); al Ing. Omar González (Unidad de Cómputo); a la Dra. Dorothy Pless (Edición de Escritos Científicos); a la Dra. Anahí Antaramian (Unidad de Proteogenómica); y finalmente a la Sra. Carmen Vázquez y a la M en C. Leonor Casanova (Unidad de Enseñanza).

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Metabolismo Energético; Nuri, Ofelia, Yunuen, Elvira, Alejandra, Laura, Perla, Lupita, Pablo, Felipe y, por todos los ratos compartidos durante todo este tiempo, por su amistad y ayuda en el laboratorio.

Al CONACyT por el otorgamiento de una beca que me permitió terminar mis estudios de doctorado.

A mis padres Rubén y Eulalia. A mis hermanos, Edgar, Israel, Orlando y Jazmín, por su entusiasmo y apoyo. A mis otros papás Laura y Felipe y a mis cuñados Roberto, Felipe, Alberto y Raúl por su apoyo.

A Irene, mi esposa, su mérito en que esta tesis se haya finalizado es casi tan grande, si no más, que el mío propio. A Omar y Arely, mis hijos, por compartir mis ilusiones y por hacer que mi trabajo haya sido más agradable y gratificante. Y, muy especialmente, a mi tío Fidel Arroyo, trabajador incansable y verdadero ejemplo de vida.

Finalmente le agradezco a la vida y a Dios por haberme permitido vivir esta experiencia única.

Esta tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección de la Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México (Proyecto 44976-M) y por la UNAM. El autor fue apoyado con una beca de Inversión al Conocimiento del CONACYT, con número de registro: 171201.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1.1 GLÁNDULA MAMARIA	4
1.1.1 Anatomía de la glándula mamaria	4
1.1.2 Desarrollo de la glándula mamaria	5
1.2 CÁNCER DE MAMA	7
1.2.1 Factores de riesgo	7
1.3 GLÁNDULA MAMARIA Y YODO	9
1.4 MECANISMO DE CAPTURA DE YODO	9
1.4.1 Transporte de yoduro mediado por el cotransportador de Na ⁺ /I ⁻ (NIS)	9
1.4.2 Transporte de yoduro mediado por el simporter Pendrina (PDS)	11
1.5 ORGANIFICACIÓN DEL YODO	12
1.6 MECANISMOS MOLECULARES DE ACCION DEL YODO	13
II. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	15
2.1 HIPOTESIS	15
2.2 OBJETIVOS	15
2.2.1 Objetivo general	15
2.2.2 Objetivos particulares	15
III. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	16
3.1 MATERIALES	16
3.2 CULTIVOS CELULARES	16
3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE NIS Y PDS	17
3.3.1 Extracción de RNA	17
3.3.2 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	17

3.4	SÍNTESIS E IDENTIFICACIÓN DE LA 6-YODO-DELTA-LACTONA .	18
3.4.1	Síntesis química	18
3.4.2	Identificación de la 6-IL por TLC y HPLC	19
3.5	ANÁLISIS DE LA CAPTURA DE RADIOYODOS EN CÉLULAS MCF7.	20
3.5.1	Ensayo de captura de radioyodos y efecto de inhibidores de NIS y PDS	20
3.5.2	Cinética de captura y efecto de la inhibición de síntesis de RNA y proteínas en la captura de I ₂	21
3.5.3	Requerimientos de Na ⁺ y energía en la captura de I ₂	21
3.5.4	Identificación de proteínas y lípidos yodados en células MCF-7 tratadas con radioyodos	21
3.5.5	Identificación de lípidos radioyodados en glándula mamaria de rata	22
3.6	IDENTIFICACIÓN DE 6-IL EN GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y TUMORAL DE RATA TRATADA CON O SIN I₂	22
3.6.1	Tratamientos	22
3.6.2	Extracción de lípidos e identificación de 6-IL por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	23
3.7	DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR, CICLO CELULAR Y APOPTOSIS	23
3.7.1	Análisis de la proliferación celular	23
3.7.1.1	Conteo celular	23
3.7.1.2	Ensayo MTT	24
3.7.2	Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	24
3.7.3	Determinación de la apoptosis y condensación de la cromatina ...	25
3.7.3.1	Cuantificación de células muertas por citometría de flujo	25
3.7.3.2	Análisis de la apoptosis por el ensayo colorimétrico APOPercentage	25
3.7.3.3	Análisis de la fragmentación nuclear por escalera de DNA	25
3.8	ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES DE PROLIFERACIÓN, CICLO CELULAR Y APOPTOSIS POR IMMUNOBLOT	26
3.8.1	Análisis de PCNA, p53, p21 ^{Waf-1} , Bax, Bcl-2 y caspasa 7 por inmunoblot	26
3.8.2	Identificación del fragmento apoptótico de PARP-1 y redistribución de AIF	26
3.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
IV.	<u>RESULTADOS</u>	28

4.1	PARTICIPACIÓN DE NIS Y PDS EN LA CAPTURA DE I₂	28
4.1.1	Efecto de NIS y PDS en la captura de I ⁻ y I ₂	28
4.1.2	La captura de I ₂ no depende de los transportadores NIS y PDS ...	29
4.2	LA CAPTURA DE I₂ DEPENDE DE UN TRANSPORTE POR DIFUSIÓN FACILITADO EN CÉLULAS MCF-7	31
4.3.2	Caracterización de la captura de I ₂ en células MCF-7	31
4.5.1	La captura de I ₂ no requiere de energía y sodio	31
4.5.2	La captura de I ₂ depende de la síntesis de proteínas	33
4.5.3	Organificación de I ₂ en lípidos y proteínas	34
4.3	PRESENCIA DE 6-IL EN LÍPIDOS DE GLÁNDULA MAMARIA TUMORAL TRATADA CRÓNICAMENTE CON I₂	38
4.3.1	Formación de lípidos yodados en glándula mamaria tratada con ¹²⁵ I ₂	38
4.3.2	Cuantificación de AA y 6-IL en lípidos de glándula mamaria normal y tumoral	38
4.4	EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL I₂, KI Y 6-IL EN CÉLULAS MCF-12F, MCF-7 Y MDA-MB 231	40
4.4.1	Efecto del I ₂ , KI y 6-IL en proliferación celular	40
4.5	EFFECTO DEL I₂ Y 6-IL EN CICLO CELULAR	45
4.5.1	I ₂ y 6-IL inducen arresto celular	45
4.2.1	p53 y p21/ ^{Waf-1} participan en el arresto inducido con I ₂ y 6-IL.....	47
4.6	EFFECTO DEL I₂ Y 6-IL EN APOPTOSIS	48
4.6.1	I ₂ y 6-IL inducen muerte celular sólo en células tumorales.....	48
4.6.2	Efecto del I ₂ y 6-IL en la apoptosis	49
4.6.3	El I ₂ y 6-IL inducen fragmentación internucleosomal	51
4.7	CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN EL EFFECTO APOPTÓTICO DEL I₂ Y 6-IL	52
4.7.1	Análisis de la expresión de Bcl-2 y Bax.....	52
4.7.2	Participación de PARP-1 y AIF en el efecto apoptótico del I ₂ y 6-IL	53
4.6.6	Activación de caspasa-7 sólo en células MCF-7 tratadas con I ₂ y 6-IL	55
V.	<u>DISCUSIÓN</u>	56
VI.	<u>CONCLUSIONES</u>	61
VII.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	62
VIII.	<u>ANEXOS</u>	70

8.1	ANEXO 1	70
8.1.1	Ciclo celular	70
8.1.2	p53 y Mdm2	72
8.1.3	proteína retinoblastoma	72
8.1.4	p21/ ^{Waf-1}	73
8.1.5	p16 y p14	73
8.1.6	Apoptosis.....	73
8.1.7	Factores inhibidores e inductores de apoptosis	75
8.1.8	Reguladores intracelulares	76
8.2	ANEXO 2	79
8.2.1	Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G and Aceves C. 2006. Uptake and Antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. <i>Endocrine-Related cancer</i>. 13, 1147-1158.	
8.3	ANEXO 3	90
	Arroyo-Helguera O, Rojas del Castillo E and Aceves C. 2007. Characterization of cell cycle arrest and signalization pathways on the antineoplastic effect of molecular iodine exert in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. <i>Carcinogenesis</i>.	

RESUMEN

Diversos estudios han mostrado el potencial antineoplásico del yodo molecular (I_2) en modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, tanto los mecanismos de captura como las vías celulares involucradas no han sido completamente analizados. En la glándula tiroides se ha reportado que el efecto apoptótico del yoduro (I^-) está mediado por la formación de 6-yodo-delta-lactona (6-IL), por la yodación del ácido araquidónico (AA). En este estudio caracterizamos el mecanismo de captura de I_2 , la formación de 6-IL *in vivo* y las vías celulares involucradas en la progresión del ciclo celular y apoptosis en las células normales (MCF-12F) y cancerosas (MCF-7 y MDA-MB 231) humanas de glándula mamaria. Nuestros resultados muestran que la captura de I_2 es independiente de NIS, PDS, Na^+ , y energía, pero es saturable y dependiente de la síntesis de proteínas; sugiriendo un sistema de difusión facilitada. La suplementación crónica con I_2 además de inhibir la carcinogénesis mamaria inducida con *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU), se acompañó de la formación de 6-IL. Las células tumorales fueron más susceptibles a iniciar procesos apoptóticos que las células normales, cuando son tratadas con I_2 , aunque son igualmente sensibles a la 6-IL. La caracterización de las vías moleculares revela que el arresto celular y la apoptosis inducida con I_2 y 6-IL dependen de la activación de las siguientes vías: 1), p53, p21^{Waf-1}, Bax, caspasa-7; y 2), poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) y el factor inductor de apoptosis (AIF). En conclusión, estos resultados demuestran que la captura de I_2 depende de un sistema de difusión facilitada, la homología en las vías moleculares activadas por I_2 y 6-IL sugieren que el efecto antineoplásico del I_2 involucra la formación intracelular de 6-IL. Las altas concentraciones de AA presentes sólo en células cancerosas, podría explicar el efecto apoptótico del I_2 únicamente en células cancerosas.

ABSTRACT

Previous studies have shown the chemopreventive potential of molecular iodine (I_2) in several *in vivo* as well as *in vitro* models. However, the I_2 uptake mechanism and cellular pathways are not completely analyzed. In thyroid gland the apoptotic effect by iodide (I^-) is mediated by derivatives of arachidonic acid (AA) named 6-iodo-delta-lactone (6-IL), by AA iodination. In this study we analyze the I_2 uptake mechanism, the 6-IL formation *in vivo* and the cellular pathways involved in cell cycle progression and apoptosis in normal (MCF-12F) and cancerous (MCF-7 and MDA-MB 231) breast cells. Our results show that I_2 uptake is independent of NIS, PDS, Na^+ , and energy, but it is saturable and dependent on protein synthesis, suggesting a facilitated diffusion system. The chronic I_2 supplementation inhibits carcinogenesis induced with *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) and is accompanied with 6-IL formation. Tumoral cells are more susceptible to apoptosis than normal cells with I_2 treatment, although all the cells are susceptible to 6-IL. The characterization of cellular pathways reveals that cell cycle arrest induced with I_2 or 6-IL is dependent on activation of two ways: 1) p53, p21^{Waf-1}, Bax and caspase-7; 2) poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and the apoptosis induced factor (AIF). In conclusion, these results demonstrate that I_2 is taken up by a facilitated diffusion system. The similar antiproliferative and apoptotic intracellular pathways activated by both I_2 and 6-IL suggest that the antineoplastic effect of I_2 in mammary cancer involves the intracellular formation of 6-IL. The higher concentration of AA only in mammary cancer cells could explain that I_2 exerts apoptotic effects only in these cells.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han realizado considerables avances en el conocimiento del cáncer de mama en el área de su biología, detección y tratamiento. Sin embargo, a nivel mundial sigue siendo la neoplasia más común en la mujer, y la segunda causa de muerte por cáncer en México. Datos epidemiológicos señalan que la dieta influye de manera significativa en el riesgo de padecer cáncer mamario, siendo las mujeres japonesas las de menor incidencia, siempre y cuando mantengan una dieta oriental. Se ha mostrado que el yodo es uno de los posibles componentes clave en esta protección. El yodo se encuentra en altas concentraciones en las algas marinas, las cuales forman parte sustancial de la dieta oriental.

Estudios en ratas con tumores mamarios inducidos con el cancerígeno Dimetilbenzo-antraceno (DMBA), a las cuales se les suplementó su dieta con algas marinas (*mekabu*), mostraron una reducción en el tamaño y el número de los tumores ya formados. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la administración de yodo en el agua de beber previene hasta en un 70% la incidencia tumoral y retrasa hasta cuatro semanas el tiempo de aparición de los tumores. Esta protección se obtuvo únicamente con el yodo molecular (I_2) y no con yoduro (I^-) o con tiroxina (T4). Además se documentó que si el tratamiento de I_2 es suspendido, la incidencia tumoral se reestablece, lo que sugiere que el efecto protector del yodo parece estar al nivel de la promoción y no de la iniciación tumoral. Aunque el mecanismo exacto mediante el cual el yodo lleva a cabo este efecto aún se desconoce, se proponen dos hipótesis: 1) el yodo actúa como antioxidante, y 2) generando derivados yodados con efectos directos sobre la replicación y/o muerte celular.

El yodo es captado por varios tejidos en forma de I^- a través de al menos dos transportadores; el cotransportador de I^-/Na^+ (NIS) y el transportador de I^- -sulfatos conocido como pendrina (PDS), sin embargo se desconoce si estos transportadores participan en la captura de I_2 .

Los objetivos del trabajo son 1) analizar *in vitro* si NIS y PDS participan en el o los mecanismos de internalización del I_2 , 2) caracterizar tanto *in vivo* como *in vitro* los mecanismos moleculares involucrados en el efecto antiproliferativo del I_2 y 3) determinar si estos efectos son mediados por la formación de yodolípidos.

1.1 GLANDULA MAMARIA

1.1.1 Anatomía de la glándula mamaria

La glándula mamaria (GM) varía anatómicamente entre los mamíferos en su localización, forma, número y tamaño; sin embargo, su estructura básica funcional es muy similar (Vaticon, 1992). Morfológicamente la GM está formada por dos componentes básicos: parénquima o tejido glandular (contiene las células secretoras y los sistemas ductales) y estroma o tejido de sostén (contiene vasos sanguíneos, conductos linfáticos, adiposo y conectivo). El parénquima se deriva embriológicamente del ectodermo, mientras que el estroma proviene del mesodermo. El tejido glandular se organiza en pequeños sacos o alvéolos, formados por una capa de epitelio glandular rodeado por células mioepiteliales contráctiles. Estas células, junto con el músculo liso que rodea a los vasos sanguíneos, constituyen el tejido contráctil de la GM. Así la unidad funcional de la GM es el alveolo y en conjunto forman el sistema de conductos que desembocan en el pezón (Figura 1) (Vaticon, 1992).

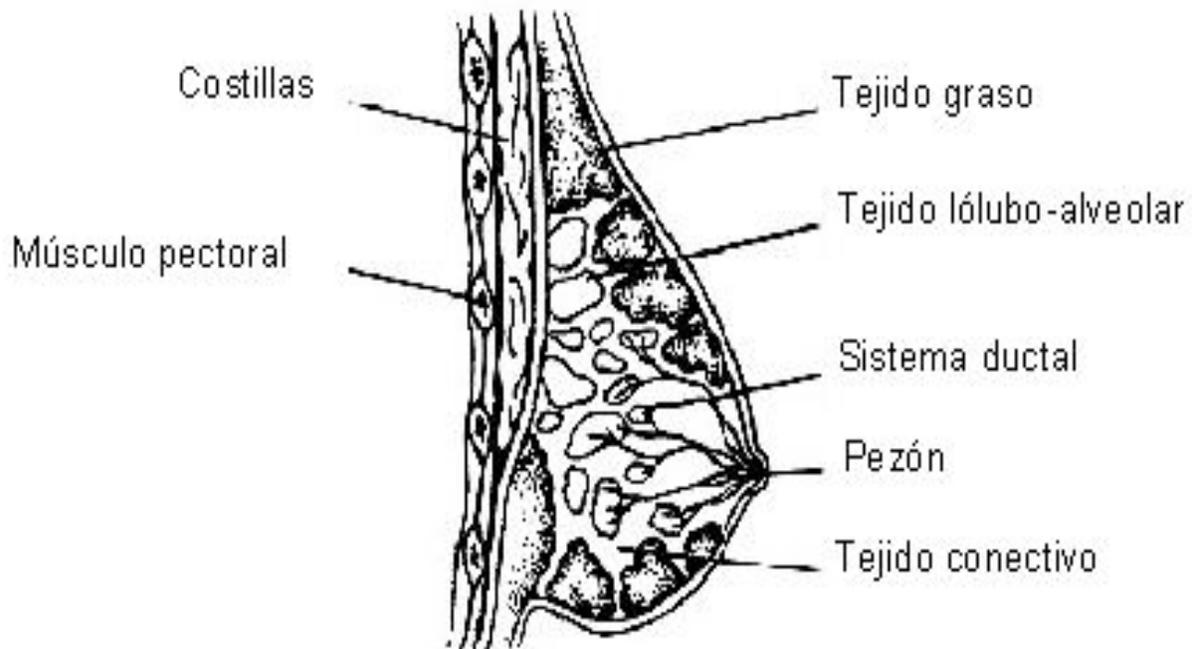


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria.

1.1.2 Desarrollo de la glándula mamaria

La figura 2, ilustra el crecimiento y la diferenciación del epitelio mamario de la rata durante la pubertad, gestación (15 días), lactancia (día 10) y la involución (72 h). Del nacimiento a la pubertad se presenta principalmente acumulación de tejido graso circundante (adipocitos) y durante los primeros ciclos estrales hay crecimiento tanto de ductos como de tejido graso. Las células epiteliales del extremo distal del ducto forman los primordios alveolares, que darán lugar posteriormente durante la gestación y lactancia a las células secretoras alveolares (Watson, 2006). La elongación ductal que ocurre durante la pubertad depende de la acción conjunta y compleja de las hormonas siguientes: estrógenos, progesterona prolactina glucocorticoides, insulina, hormonas tiroideas y hormona de crecimiento (Ganong, 1990 y Watson, 2006).

Durante la gestación ocurre una extensa ramificación de ductos y el número de las células epiteliales se incrementa significativamente en respuesta a los estímulos hormonales (progesterona y prolactina), y paracrinos (factores de crecimiento). Durante esta expansión los extremos distales de los ductos desaparecen para ser remplazados por los brotes alveolares (Watson, 2006).

Después del parto, la glándula empieza a ser un órgano secretor, los lóbulos alveolares se expanden para llenar la glándula y producir leche (Watson, 2006). El incremento en prolactina y la disminución de los estrógenos y la progesterona, producen una secreción copiosa de leche, mientras que la oxitocina participa en su evacuación (Ganong, 1990).

Durante el destete ocurre la involución de la GM, este evento involucra un proceso apoptótico que provoca el colapso de los alvéolos secretores, los cuales desaparecen a los 10 días después del destete, y la glándula regresa a un estado similar de pre-gestación (Watson, 2006).

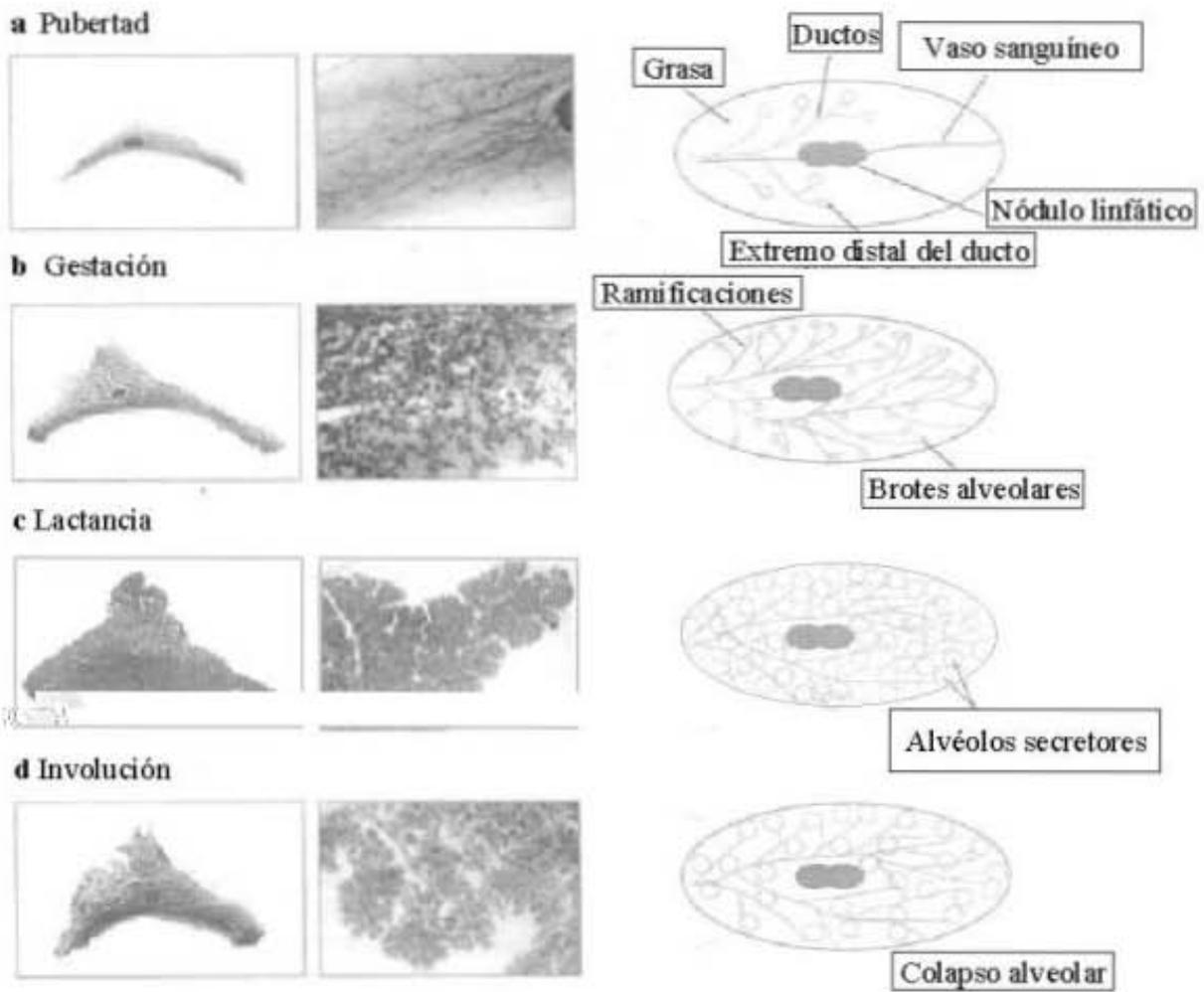


Figura 2. Fases del desarrollo de la glándula mamaria de rata. Se muestra el análisis de preparaciones de montaje completo (whole-mount) y esquema de la glándula mamaria (modificado de Watson, 2006).

1.2 CÁNCER DE MAMA

1.2.1 Factores de riesgo

El cáncer mamario ocupa mundialmente el primer lugar en incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres en edad reproductiva. En México, es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, después del cérvico-uterino. Se han señalado diversos factores de riesgo, aunque los más estudiados hasta el momento son: el factor genético, la historia reproductiva y el factor dietético y/o ambiental (Medina, 2004). El factor genético sólo explica el 5% de los casos de cáncer de mama, y se asocia principalmente a mutaciones heredables en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Higginson, 1993).

Respecto a la historia reproductiva, se ha señalado que una menarca temprana y el total de años de exposición a hormonas es un factor de riesgo que incrementa la incidencia, mientras que la edad del primer embarazo (antes de los 20 años) es un fuerte factor protector comparado con mujeres nulíparas (Kelsey y Gammon, 1991; Feigelson y Henderson, 1996). Se ha señalado que esta protección es secundaria al alto recambio y diferenciación del tejido mamario que sólo ocurre durante el embarazo y la lactancia. Es decir, al completarse la diferenciación del tejido alveolar, la susceptibilidad de estas células a volverse cancerosas disminuye o desaparece (Kelsey y Gammon, 1991; Feigelson y Henderson, 1996; Russo y Russo, 1994; Russo y Russo, 1997). Esta protección se presenta en todos los grupos étnicos y se ha corroborado en experimentos con ratas y ratones expuestos a cancerígenos (Yang et al., 1999). No obstante lo anterior, mujeres con múltiples embarazos no presentan esta protección y en el caso de las mujeres menores de 20 años la protección la adquiere sólo el 50%. Lo que sugiere que intervienen también otros factores (Seidman et al., 1982).

Con relación al factor dietético, diversos estudios han revelado que el cáncer de mama es menos frecuente (de 3 a 5 veces menos) en mujeres de origen Asiático que en el resto del mundo (Figura 3) (Adami et al., 1998; Ziegler et al 1993).

Incidencia de cáncer mamario

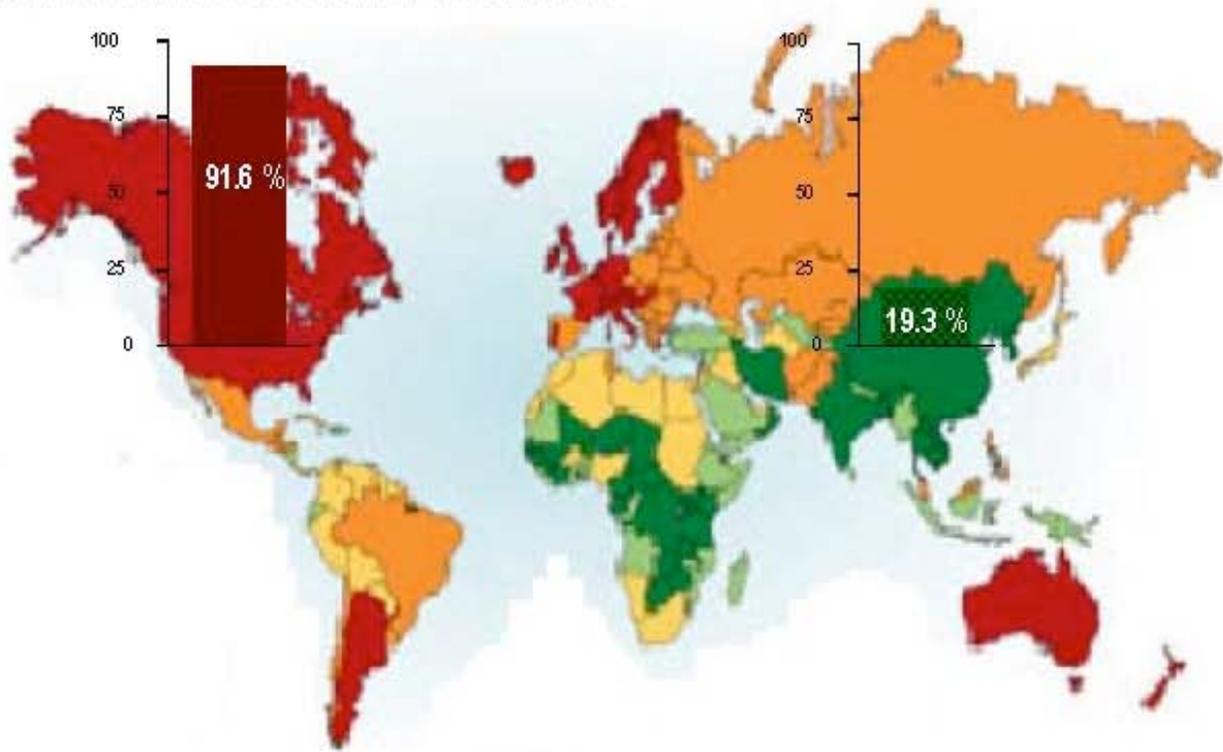


Figura 3. Incidencia de cáncer mamario. Color rojo países con alta incidencia como EUA vs países de baja incidencia como China (color verde).

1.3 GLANDULA MAMARIA Y YODO

El amplio consumo de algas marinas como el *wakame*, *nori* y *mekabu* (son altamente consumidos en sopas, sushi, ensaladas y como condimento), se han asociado a la baja incidencia de fibrosis y cáncer mamario en las mujeres asiáticas. Este efecto protector prevalece siempre y cuando la dieta oriental se mantenga, ya que en mujeres orientales que emigran u “occidentalizan” su dieta, la incidencia tumoral se iguala al resto del mundo (Wynder et al., 1991; Kodama et al., 1991a; Kodama y Kodama, 1991; Cann et al., 2000; Smyth, 2003; Aceves et al., 2006). Las algas marinas son altamente ricas en yodo (30,000 veces más que cualquier otro ser vivo) y lo contienen en diversas formas químicas (yoduros, I_2 y yodo unido a proteínas) (Kupper, 2001). Los japoneses consumen 25 veces más yodo que en occidente (5280 ug/día vs 166-209 ug/día que USA o Inglaterra). Además, en la medicina tradicional oriental los tumores o nodulaciones mamarias son “ablandadas” con vapores de algas marinas del tipo *wakame* (Cann et al., 2000; Smyth, 2003).

La deficiencia crónica de yodo se acompaña de alteraciones en el epitelio mamario que incluyen hiperplasia perilobular, fibrosis mamaria y fibroadenomas, que son fácilmente reversibles con la administración de I_2 y no I^- (Eskin et al., 1995). Similarmente el tratamiento con I_2 en pacientes con enfermedades mamarias benignas (fibrosis) se acompaña de una disminución significativa en el tamaño de la lesión y en la remisión de los síntomas, lo cual no se observó cuando se trató sólo con I^- (Ghent et al., 1993, Kessler, 2004). Estudios *in vivo* en ratas muestran que la administración de Lugol (solución de yodo que contiene I_2 y I^-) en el agua para beber (0.05 %), reduce significativamente el tamaño de los tumores mamarios inducidos con el cancerígeno 7,12 dimetilbenz[α]antraceno (DMBA) (Funahashi et al., 1999; Funahashi et al., 2001).

1.4 MECANISMOS DE CAPTURA DE YODO

1.4.1 Transporte de yoduro mediado por el cotransportador NIS

El transporte membranal del yodo en forma de I^- se conoce desde el siglo pasado. Precisamente inicia en 1915, cuando se observó que las células foliculares de la tiroides concentraban I^- (Marine y Feiss, 1995). Ochenta años después, se aisló el cDNA que

codifica para el cotransportador de Na^+/I^- (NIS) (Dai et al., 1996). NIS pertenece a la familia 5A de transportadores de solutos SLC5A. Esta familia incluye a la familia de cotransportadores Na^+ -glucosa (SLC5A1), el co-transportador Na^+ -glucosa de baja afinidad (SLC5A2), el transportador Na^+ -mioinositol (SLC5A3), el cotransportador de prolina dependiente de Na^+ (SLC5A4), y el transportador de multivitaminas dependiente de Na^+ (SLC5A6) (Carrasco, 1993; De la Vieja et al., 2000).

NIS es una glicoproteína con 13 dominios transmembranales (Figura 4) que cataliza el transporte activo del I^- dentro de las células foliculares tiroideas, lo cual es un paso crucial en la biosíntesis de las tironinas: tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). NIS cataliza el transporte de yoduro tanto en la tiroides como en otros tejidos (vgr glándula mamaria lactante, glándulas salivales, plexos coroideos y mucosa gástrica) mediante la translocación simultánea de Na^+ (a favor de su gradiente) y I^- (en contra de su gradiente), hacia el interior de la célula. Por lo tanto, NIS es un cotransportador, es decir, transporta ambos sustratos (Na^+ y I^-) simultáneamente y en la misma dirección (Carrasco, 1993). La fuerza electromotriz de NIS está dada por el gradiente de concentración de Na^+ (gradiente dirigido hacia el interior de la célula) generado por la ATPasa Na^+/K^+ (Bagchi y Fawcett, 1973; Weiss et al., 1974; Carrasco, 2000; De la Vieja et al., 2000).

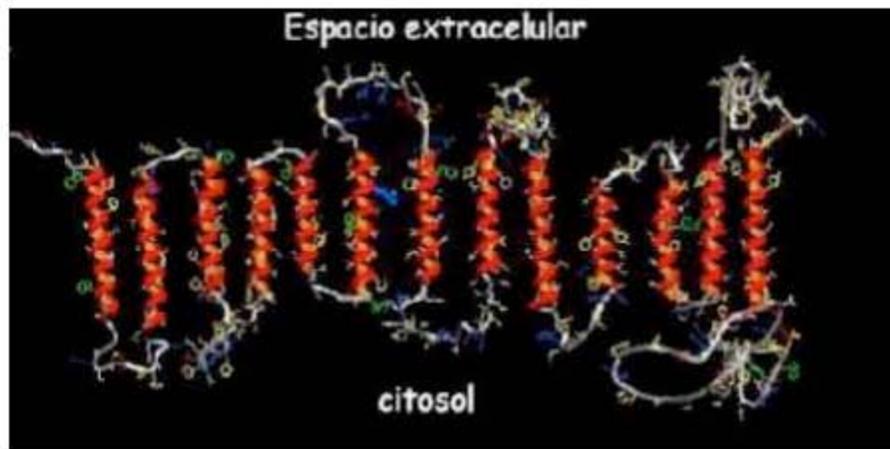


Figura 4. Modelo actual de la estructura secundaria de NIS. El extremo NH2 mira hacia el medio extracelular y el COOH hacia el citosol. Figura tomada de (De la Vieja et al., 2002).

1.4.2 Transporte de yoduro mediado por el intercambiador Pendrina (PDS)

Además de NIS, se conoce la existencia de un segundo transportador de yoduro sensible a inhibirse con ácido disulfónico-2,2'-estilbeno-4,4'-diisotiocianato (DIDS) en células tiroideas y epiteliales de glándula mamaria. Este transportador se identificó como un intercambiador de aniones y se conoce como Pendrina (PDS) (Shennan y Boyd, 1986; Rillema y Hill., 2003). Aunque este transportador se encuentra en la membrana apical de los tirocitos normales y se encarga de transportar al I^- al lumen folicular, también se ha descrito en la membrana basal de las células cancerosas de tiroides y de mama. El gen de PDS consiste de 21 exones, que codifican para una proteína de 780 aminoácidos con 12 dominios transmembranales (Figura 5) (Royaux et al., 2000).

Además de la participación de NIS y PDS en la captura de yoduro, recientemente se caracterizó un nuevo transportador de I^- en la glándula tiroides (GT), denominado transportador de I^- Apical Humano (hAIT). Este transportador se encuentra en la región apical del tirocito y muestra un 70% de homología con NIS y se encarga de sacar el I^- de la membrana apical al lumen folicular de forma similar a PDS (Lacroix et al., 2004).

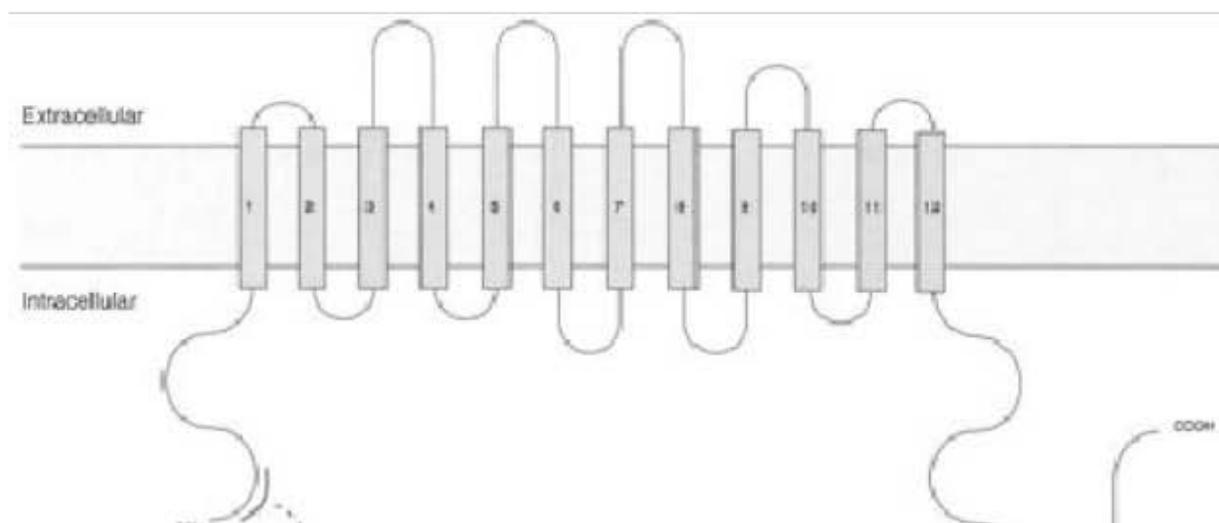


Figura 5. Modelo actual de la estructura secundaria de PDS. Los extremos NH_2 y $COOH$ miran hacia el citosol. Figura tomada de (Royaux et al., 2000).

Con respecto al I_2 se desconoce su mecanismo de captura. Los únicos estudios que analizan la captación de I_2 por sistemas vivos son los realizados en algas marinas café del género *Laminaria*. En este estudio mostraron que el I^- presente en el agua de mar es oxidado por la exoenzima haloperoxidasa convirtiéndolo a I_2 o ácido hipoyodoso, para entonces ser transportado por un sistema de difusión facilitada (Kupper et al., 1998).

1.5 ORGANIFICACIÓN DEL YODO

La GT es capaz de sintetizar dos tipos de compuestos yodados: a) yodotironinas y b) lípidos yodados. En ambos casos, el I^- debe ser oxidado por una enzima específica conocida como tiroperoxidasa (TPO), la cual reduce el I^- a diversas especies reducidas del yodo como: I^+ (yodonio), I^0 (yodo radical libre), IO^- (hipoyodito), HIO, y I_2 (Smyth, 2003). Aunque no se ha determinado con exactitud qué forma de yodo se une a la tiroglobulina para formar las tironinas y cuál a los lípidos, se postula que las formas hidrofóbicas pueden reaccionar de manera preferencial con los ácidos grasos de cadena larga dando lugar a la formación de lípidos yodados. Este proceso conocido como yodolactonización está restringido a los ácidos carboxílicos insaturados β - γ , γ - δ y δ - ϵ de los ácidos araquidónico (Dugrillon et al., 1990). Se ha demostrado que la GT de rata (Boeynaems y Hubard., 1980), cerdo (Dugrillon et al., 1990) y otras especies, producen la 6-yodo-delta-lactona (6-IL) y la 14-yodo-omega-lactona (14-yodolactona) tanto *in vivo* (en glándula tiroides) como *in vitro* (cultivos primarios de tirocitos) (Boeynaems y Hubbard, 1980; Dugrillon et al., 1990) (Figura 6).

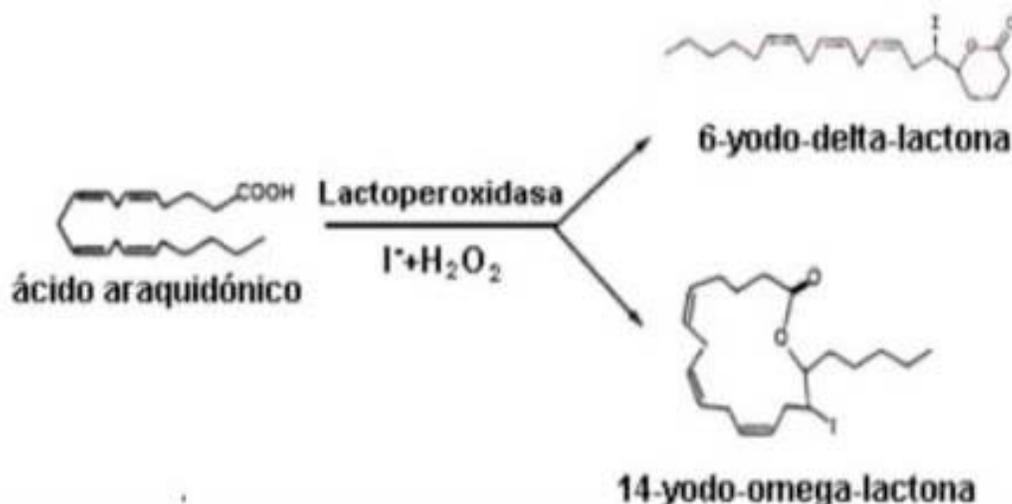


Figura 6. Formación de yodolactonas a partir de ácido araquidónico en presencia de lactoperoxidasa.

Para el caso de la GM, se desconoce si se forman lípidos yodados. Sin embargo, se sabe que la GM gestante y lactante expresan NIS, PDS y LPO maquinaria necesaria para la captación, oxidación y organificación del I⁻ a proteínas y/o lípidos (Boeynaems y Hubbard, 1980; Carrasco, 2000; Rillema y Hill, 2003). En contraste, la GM virgen, aunque capta I⁻ a partir de PDS y NIS no expresa LPO, sugiriendo una incapacidad de oxidar el I⁻ (García-Solís et al., 2005). Sin embargo, experimentos *in vitro* mostraron que la administración de I₂ se acompaña de la formación de T₄ en ausencia de LPO (Thrall et al., 1992), indicando que el I₂ no requiere de esta enzima para ser incorporado a lípidos o proteínas. Aunado a esto, se ha demostrado que los tumores mamarios inducidos con DMBA presentan altas concentraciones de ácido araquidónico, en comparación con las bajas concentraciones en la glándula mamaria normal (Rillema y Mulder, 1978).

1.6 MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DEL YODO

Aunque se desconoce el mecanismo exacto de la acción del I₂, se ha sugerido que actúa a nivel de la proliferación celular y/o ejerciendo un efecto antioxidante. Respecto a su efecto antiproliferativo, estudios en cultivos celulares de tirocitos de rata, indican que el tratamiento de I⁻ causa un arresto celular en las fases de G₁-S y de G₂-M (Tramontano et al., 1989; Smerdely et al., 1993). Por otra parte, el exceso de I⁻ (50 mM) causa apoptosis en las células tiroideas (TAD-2), proceso que no involucra cambios en la expresión de p53 o genes pro y anti-apoptóticos como: Bax, Bcl-2 y Bcl-X_L (Vitale et al., 2000). En GT el tratamiento con I⁻ está mediado por la formación de lípidos yodados, específicamente yodolactonas. Al respecto, el tratamiento con 6-IL en cultivos de tirocitos aislados de tiroides inhibe la expresión del factor de crecimiento epidermal (EGF) y ejerce un efecto apoptótico (Dugrillon y Gartner, 1995; Langer et al., 2003). Para el caso de GM, estudios en el laboratorio, han demostrado en ratas, que la administración crónica de I₂ y no de I⁻ ó T₄ ejerce un potente efecto antineoplásico a nivel de la promoción tumoral mamaria inducida con el cancerígeno N-Metyl-Nitrosourea (MNU). Este efecto involucra una disminución en la proliferación así como un incremento en la apoptosis, sin cambios aparentes en la expresión del mRNA de p53 (García-Solís., et al 2005). En estudios *in vitro*, el tratamiento con 4 μM de Lugol (mezcla de KI y I₂) indujo apoptosis en diversas líneas

celulares humanas de cáncer mamario (MCF-7, ZR-75-1 y T-47D). En este estudio se demostró que el efecto apoptótico del yodo está asociado a la liberación mitocondrial dependiente de p53 y Bax de los factores apoptóticos AIF y citocromo c (Shrivastava et al., 2006).

Otro de los mecanismos propuestos para el efecto protector del yodo, es su potente efecto antioxidante, incluso más eficiente que la vitamina E, el glutati6n y el 6cido asc6rbico (Tseng y Latham, 1984; Venturi y Venturi, 1999; Garc6a-Sol6s et al., 2005). En la c6lula el I⁻ actúa como un donador de electrones en presencia de H₂O₂, v6a enzimas peroxidasas. Durante esta reacci6n queda libre un 6tomo de yodo (I⁺) el cual puede yodar residuos de tirosina, histidina o algunos 6cidos grasos insaturados (por ejemplo, 6cido araquid6nico y/o 6cido docosahexaenoico) compitiendo en esta forma por los sitios donde actúan los radicales libres (Venturi y Venturi, 2000, Cocchi y Venturi., 2000). Otro mecanismo es que el yodo actúe como un antioxidante captando directamente radicales OH[•] y generando compuestos yodados neutros como la 6-yodolactona (6-IL).

Finalmente, una tercera posibilidad es que el yodo pueda incrementar la inducci6n y/o la actividad de enzimas antioxidantes. Estudios *in vivo* en pacientes a los que se les suplement6 la dieta con I⁻ o con salmueras de yodo, muestran un incremento en la actividad catalasa y glutati6n peroxidasa, as6 como un aumento general en la capacidad antioxidante (Moser et al., 1994; Winkler et al., 2000). La inducci6n de la expresi6n de la enzima catalasa fue recientemente corroborada por nosotros en ratas tratadas cr6nicamente con I₂, donde tanto los tejidos normales da±ados como los tumorales de gl6ndula mamaria exhiben incrementos tanto en la expresi6n como en la actividad de esta enzima (Alfaro Y et al., 2006).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Este estudio propone que el I₂ utiliza un transportador diferente de NIS y PDS, y que los efectos antiproliferativos y/o apoptóticos están mediados por la incorporación del I₂ a lípidos específicos como la 6-IL.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

- Caracterizar el o los mecanismos celulares involucrados en la captura y efecto protector del I₂ en el cáncer mamario

2.2.2 Objetivos particulares

Modelos *in vitro*: Utilizando líneas celulares de cáncer mamario humano:

- Determinar la participación de NIS y PDS en la captura del I₂
- Evaluar el efecto antiproliferativo y/o apoptótico del I₂, I⁻ y/o 6-IL
- Caracterizar las vías intracelulares involucradas en los efectos del I₂

Modelos *in vivo*: Ratas Sprague Dawley tratadas con el cancerígeno MNU

- Identificar si el tratamiento crónico con I₂ produce la 6-IL en glándula mamaria normal o tumoral.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), la solución de sales balanceadas de Hank (HBSS), el suero fetal bovino (FBS) y las soluciones de penicilina, estreptomicina y tripsina 0.05%-EDTA 0.2 g/L fueron obtenidas de GIBCO-BRL (Grand Island, NY). El ^{125}I fue obtenido de NEN Life Science Products (Boston, MA). El ácido retinoico todo trans (RA), DIDS, ácido araquidónico, bromuro de tetrazolio 2,5-difenil 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl-) (MTT), azida de sodio, timerosal, α -amanitina y sílica gel fueron obtenidos de SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO). Cicloheximida (CHX) fue obtenida de Calbiochem (La Jolla, CA). PTU fue obtenido de US Biochemical. Co. (Cleveland, OH). Todas las soluciones restantes fueron obtenidas de SIGMA Chemical Co (St Louis, MO). Los anticuerpos contra p53 (policlonal hecho en ratón), Bcl-2 (policlonal hecho en ratón), Bax y actina (policlonales hechos en conejo) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, C.A.

3.2 CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares MCF-7 (ATCC HTB-22) y MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) fueron amablemente cedidas del Instituto Nacional de Cancerología de México (INCAN). Los fibroblastos de ratón (3T3) fueron donadas por el Instituto de Neurobiología (INB) de la UNAM. La línea celular MCF-12F se obtuvo de la ATCC (CRL-10783). Todas las líneas celulares se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS, 100 U/ml penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina (medio basal) por 24 horas a 37°C y 5 % CO_2 . Para cada una de las líneas celulares el medio se renovó cada 2 ó 3 días por aspiración y adición de medio fresco. Cuando los cultivos llegaron a un estado de subconfluencia, se procedió a expandirlos previos lavados con PBS 1x y tripsina al 0.05 %.

3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE NIS Y PDS

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se hizo con TRIzol® (Life Technologies), siguiendo el protocolo que a continuación se detalla. Las células en cajas de 10 cm² se mantuvieron en hielo, se homogenizaron con 1 mL de TRIzol y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 0.2 mL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol y se incubaron durante 2-3 min. Se agitaron durante 15 segundos, se incubaron y después de 2-3 min se centrifugaron a 12,000 g durante 10 min a 4°C. Después de la centrifugación se separó la fase acuosa (arriba) y el RNA se precipitó con 0.5 mL de isopropanol, luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se centrifugaron a 12,000 g, durante 10 min a 4°C. El botón se lavó con 1 mL de etanol al 75% frío y se centrifugó a 7,500 g durante 5 min a 4°C. Después de evaporar el etanol el botón se resuspendió en agua estéril.

3.3.2 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La retrotranscripción se realizó con 3 µg del RNA total extraído con TRIzol, cuya concentración se determinó por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 650). Al RNA se le añadieron 10 pmoles de oligo d(T) y se incubó durante 5 minutos a 45°C, posteriormente se agregó el amortiguador con MgCl₂, la mezcla de desoxinucleótidos 10 nM, y la enzima Superscript reversa transcriptasa y se incubó durante 1 hora a 37°C, seguido de 5 minutos a 95°C. El DNA complementario (cDNA) obtenido, se congeló a -20°C. La reacción de PCR se llevó a cabo a una concentración final de 50 µL conteniendo: 1 µL de dNTP Mix (Invitrogen Life-Technologies), 5 µL del amortiguador 10x (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.3, gelatina 10 µg/mL), 2.5 µL de 30 mM de MgCl₂, 1 µL de 10 pmolas de oligonucleótidos iniciadores y 5 U de la Taq DNA polimerasa, mas cDNA (1-4 µL). Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificar los fragmentos de DNA complementario de NIS (453 pb), PDS (602 pb), y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (545 pb) de. GAPDH se muestran en la tabla 1. GAPDH se usó como control para verificar la cantidad e integridad del RNA, la reacción de RT-PCR se llevó a cabo como lo describe previamente (Arroyo-Helguera et al., 2005). Brevemente, las muestras se

desnaturalizaron a 94°C por 45 s, seguido de 32 ciclos, cada uno con las siguientes variaciones en la temperatura: 94°C por 45 s, 54.5°C para GAPDH y NIS, 60°C para PDS durante 45 s, y 72°C por 1 min. El último ciclo se realizó con una extensión de 3 minutos a 72°C. La electroforesis de los fragmentos amplificados se realizó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo un transiluminador de UV. El tamaño de las bandas se confirmó usando una escalera comercial de DNA (1 Kb DNA ladder, GIBCO-BRL). Después se le tomó una fotografía Polaroid usando un Scanner Hewlett Packard Jet 11CX.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para PCR

mRNA	Número de acceso a GenBank	Sentido/antisentido (5' a 3')
GAPDH, nt. 472-1017	BC083511	GACAACAGCCTCAAGATCATCAG/TTGCTGTAGC CAAATTCGTTGTAC
PDS, nt. 1928-2553	AF030880	CACAGTTGGATTTGATGCCACTAGAGTA/TACGC ATAGCCTCATCCTGGACAT
NIS, nt., 630-1083	NM-000453	CTTCTGAACTCGGTCCTCAC/GAGCCGCTATACAT TCTGGA

3.4 SÍNTESIS DE LA 6-YODO-DELTA-LACTONA

3.4.1 Síntesis química

La 6-IL se sintetizó como lo describe Monteagudo et al., (1992). Donde, a 67 mg de AA en 8.5 mL de tetrahidrofurano (THF) y agua (5 mL) se les adicionó a 4° C bicarbonato de potasio (50 mg), yoduro de potasio (133 mg) y I₂ (203 mg). Después de 4 días a 4°C protegidas de la luz se adicionó tiosulfato de sodio (para clarificar). El contenido se volcó en 20 mL de agua destilada, la fase orgánica se extrajo 5 veces con 20 mL de diclorometano (CH₂Cl₂). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se dejó 4°C durante 10 horas. Después de filtrar la fase orgánica se evaporó a sequedad con gas nitrógeno y se resuspendió en 0.5 mL de (CH₂Cl₂). La 6-IL radiactiva se sintetizó incubando 1 mCi de ¹²⁵I en 2.5 µL de cloramina T (0.5 mg/mL en PBS) más 5 mg de

AA en 8 mL de acetonitrilo por 4 horas a 4°C. Después de los tiempos de reacción la fase orgánica se aisló siguiendo el procedimiento arriba descrito. Las mezclas conteniendo la 6-IL o 6-IL radiactiva se eluyó en una columna cromatográfica de sílica gel (tamaño de la partícula, 230-400 mesh 60 Å). Como sistema eluyente se usó CH₂Cl₂:MeOH (97.5:2.5 v/v). Se colectaron 10 fracciones de 10 mL (conteniendo la 6-IL) y se evaporaron a sequedad con gas nitrógeno y se resuspendieron en EtOH absoluto.

3.4.2 Identificación de la 6-IL por TLC y HPLC

La pureza se determinó por cromatografía en capa fina ascendente (TLC), usando CH₂Cl₂:MeOH (97.5: 2.5%, v/v) como sistema eluyente. La 6-IL fría y el AA se detectaron con I₂ sublimado. La identificación se determinó como lo describe Monteagudo et al., (1992) calculando el factor de retención (rf) de la 6-IL (0.75) y AA (0.5) donde, rf= distancia que se desplazó la sustancia problema/ distancia alcanzada por la fase móvil (Figura 7A). La 6-IL radiactiva se identificó por autoradiografía. También se identificó la 6-IL y AA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando una columna µBondapak C₁₈ (3.9 x 300 mm; tamaño de la partícula, 10 µM). Para ello realizamos una curva con 6-IL fría y AA (25 a 500 pmol) utilizando un gradiente con la solución A compuesta de CH₃CN-H₂O (1:2, vol/vol) y de la solución B compuesta de CH₃CN-H₂O (2:1, vol/vol). Los tiempos de retención para la 6-IL de 21 min y 13 min para el AA, coinciden por lo reportado por Boeynaems JM y Hubbard WC (1980) y Dugrillon et al., (1990) (Figura 7B).

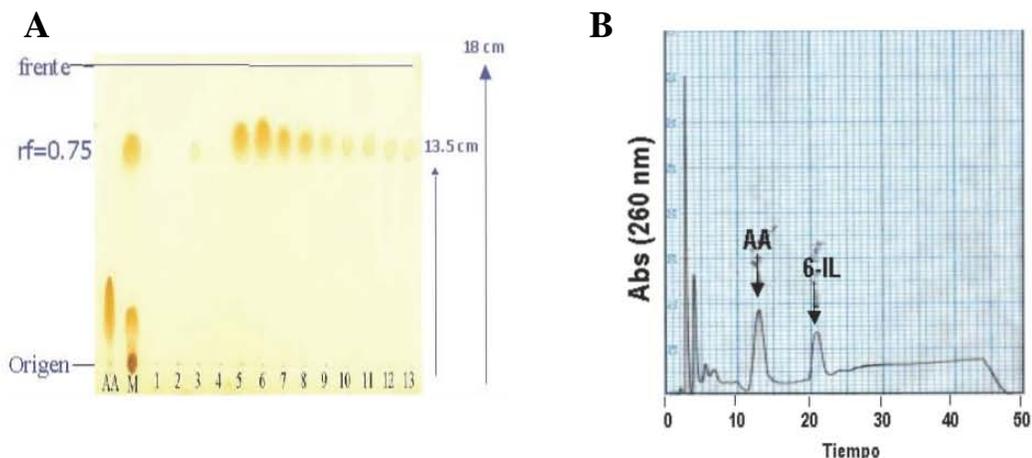


Figura 7. Síntesis química de 6-IL a partir de ácido araquidónico. La síntesis se llevó a cabo como se describe en material y métodos. **A**, AA, ácido araquidónico; M, mezcla conteniendo AA, THF, I₂, KI después de 4 días de reacción; 1-13, fracciones puras con la 6-IL obtenidas de la columna cromatográfica. **B**, cromatograma proveniente del HPLC con los tiempos de retención para AA (12.5 min) y 6-IL (21 min) (6-IL).

3.5 ANÁLISIS DE LA CAPTURA DE RADIOYODOS EN CÉLULAS MCF-7

3.5.1 Ensayo de captura de radioyodos y efecto de inhibidores de NIS y PDS

El procedimiento ha sido descrito por Kogai et al., (2000) aunque se realizaron modificaciones mínimas. Brevemente, para inducir la expresión del NIS las células se trataron con 1 μM de ácido retinoico (AR) por 48 h a 37°C en medio basal (NIS⁺). Células NIS⁻ y NIS⁺ se incubaron con 0.005 μCi de $^{125}\text{I}^-$ más 2 μM de KI (actividad específica de 1.25 mCi/mmol) o 0.005 μCi de $^{125}\text{I}_2$ por la oxidación del $^{125}\text{I}^-$ con H_2O_2 y HCL descrito por McAlpine (1945) más 2 μM de I_2 (actividad específica de 1.25 mCi/mmol). Al final de los periodos de incubación de 5, 15, 30 y 60 minutos, los platos se colocaron sobre hielo y el medio HBSS conteniendo $^{125}\text{I}^-$ o $^{125}\text{I}_2$ se removió y las células se lavaron dos veces con 1 mL de PBS. Posteriormente, las células se colectaron y se midió la radiactividad en un contador de centelleo gamma. Para determinar el efecto de los inhibidores de NIS y PDS sobre la captura de I_2 , células NIS⁻ y NIS⁺ se incubaron con DIDS (0.1 a 1mM) ó 5 a 50 μM de KClO_4 antes de la adición de 1.25 mCi/mmol de $^{125}\text{I}^-$ ó $^{125}\text{I}_2$ a 37°C por 15 min. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y la radiactividad se normalizó al número de células al momento del ensayo.

3.5.2 Cinética de captura y efecto de la inhibición de síntesis de RNA y proteínas en la captura de I_2

Los estudios cinéticos se realizaron incubando células MCF-7 sin AR en presencia de 0.1 a 10 μM de I_2 más 1.25 mCi/mmol de $^{125}\text{I}_2$ a 37°C durante 5 min, después de la incubación las células se lavaron con PBS y la radiactividad se normalizó al número de células al momento del ensayo. Para analizar el efecto de síntesis de RNA y proteínas en la captura de I_2 , las células MCF-7 se preincubaron por 30, 60 y 120 min en la presencia o ausencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ cicloheximida (CHX) ó 5 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina, posteriormente se lavaron con PBS para remover las drogas, después se realizó una siguiente incubación con 1.25 mCi/mmol de $^{125}\text{I}_2$ a 37°C por 15 min. Se lavaron con PBS y la radiactividad se midió en un contador de centelleo gamma.

3.5.3 Requerimientos de Na⁺ y energía en la captura de I_2

Para analizar la dependencia de sodio (Na⁺) en la captura de I₂, las células se incubaron por 15 minutos en amortiguador de Krebs-Ringer (KRB-Na⁺) (125 mM NaCl, 4.8 mM KCL, 2.6 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5.6 mM glucosa, 25 mM HEPES, y 1mM de ácido ascórbico) ajustado a pH 7.35 o sustituyendo equimolarmente NaCl por LiCl (KRB sin Na⁺). Después de la preincubación, el KRB-Na⁺ o KRB sin Na⁺ se removió y las células se incubaron con KRB-Na⁺ o KRB sin Na⁺ más 1.25 mCi/mmol de ¹²⁵I₂ a 37°C por 15 minutos. Para los requerimientos de energía, las células MCF-7 se preincubaron a 37°C por 30 min en HBSS con y sin 10 mM de azida de sodio (inhibidor del transporte de electrones) o timerosal (inhibidor de la ATPasa de Na⁺/K⁺). Después se lavaron las células y se incubaron en medio HBSS con 1.25 mCi/mmol de ¹²⁵I₂ a 37°C por 15 min. Se lavaron con PBS y la radiactividad se midió en un contador de centelleo gamma.

3.5.4 Identificación de proteínas y lípidos yodados en MCF-7 tratadas con radioyodos

Células NIS⁺ se trataron con y sin propilthiouracil (PTU), el cual es un inhibidor de peroxidasa, a una concentración de 100 µM antes de adicionar 1.25 mCi/mmol de ¹²⁵I₂ o ¹²⁵I⁻ en medio HBSS. Después de 15 y 60 minutos, las células se lisaron con el amortiguador RIPA más el inhibidor de proteasas Mini Complete (Roche) o precipitando con 10% de ácido tricloroacético (TCA). La fracción lipídica se extrajo acorde al procedimiento de Bligh y Dyer (1959), brevemente, las células se homogeneizaron en 150 µL de amortiguador RIPA, posteriormente se agregaron 600 µL de cloroformo/metanol (2/1), más 200 µL de cloroformo y agua. La marca radiactiva en la fase orgánica se cuantificó en un contador gamma y se expresó como cpm/ número de células. La concentración de proteínas se estimó usando el método Bradford (Biorad). Las muestras se calentaron a 75°C por 3 min en el amortiguador de corrida [10% glicerol, 2% SDS, 62.5 mM TRIS-HCL (pH 6.8) con 2-mercaptoetanol]. La electroforesis se realizó con 50 µg de proteína en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %. Posteriormente, el gel SDS-PAGE semiseco se expuso en una pantalla intensificadora y se escaneó en un Storm phosphoimager (Applied Biosystem). Los lípidos se separaron junto con AA y la 6-IL como estándares por cromatografía en capa fina ascendente (TLC) usando CH₂Cl₂:MeOH (97.5: 2.5%, v/v) como sistema eluyente. Posteriormente se revelaron en una cámara con I₂ sublimado y se expusieron en una pantalla intensificadora y se escanearon en un Storm phosphoimager (Applied Biosystem).

3.5.5 Identificación de lípidos radioyodados en glándula mamaria de rata

Ratas hembra Sprague-Dawley de 4 semanas de edad, recibieron 50 $\mu\text{Ci/rata}$ i.p de $^{125}\text{I}^-$ ó $^{125}\text{I}_2$. En grupos paralelos 2 horas antes de la inyección de radioyodos, se les administraron 6 mg/rata i.p. de perclorato (KClO_4) y 10mg/rata de Furosemida. Todos los animales se sacrificaron 1 hora después de la administración de radioyodos. La GM se colectó, pesó y la radiactividad de 500 mg de GM se midió en un contador gamma (Cuentas totales). Posteriormente se extrajeron los lípidos por el método Bligh y Dyer (1959), descrito anteriormente. Los datos se normalizaron con la siguiente fórmula y se presentaron como porcentaje de yodo: (cuentas de las fracciones /cuentas totales) x 100= % de yodo.

3.6 IDENTIFICACIÓN DE 6-IL EN GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y TUMORAL DE RATA TRATADA CON Ó SIN I_2

3.6.1 Tratamientos

Ratas hembra Sprague Dawley de 5 semanas de edad se dividieron como sigue: 1). Control sin I_2 tratamientos (ctrl); 2). Control + 0.05% I_2 (ctrl. + I_2); 3). Control + MNU (ctrl + MNU); 4). MNU + 0.05% I_2 (ctrl MNU+ I_2). Los tratamientos de yodo se iniciaron 2 semanas antes de administrar intraperitonealmente una dosis única de 50 mg/kg/peso de MNU (Sigma St. Louis, MO). Los animales mantuvieron los tratamientos por 9 semanas. El MNU se calentó a 50-60°C y disolvió en 0.9 de agua salina a pH 5.0 (Thompson, 2000). La cantidad de I_2 se determinó por el método de titulación con tiosulfato de sodio (Kendel, 1994).

3.6.2 Extracción de lípidos e identificación de la 6-IL por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC)

La glándula mamaria normal y tumoral se colectó y congeló con hielo seco, 500 mg se utilizaron para la extracción de lípidos por el método Bligh y Dyer (1959) descrito anteriormente. Las muestras de lípidos de glándula mamaria normal y tumoral disueltas en cloroformo, se evaporaron con N₂ y se almacenaron a -70°C y antes del análisis se reconstituyeron en 300 µL de EtOH al 100%. Los estándares de 6-IL y AA disueltos en EtOH se mantuvieron en viales ámbar, en hielo y en oscuridad. Cien µL de las muestras de lípidos se inyectaron al sistema de HPLC. La absorción se detectó a 206 nm con un detector UV y una columna µBondapak C₁₈ (3.9x 300 mm; tamaño de la partícula, 10µm), a través del cual se hizo pasar, a un flujo de 1 mL/min, una fase móvil compuesta de la solución A compuesta de CH₃CN-H₂O (1:2, vol/vol) y una solución B compuesta de CH₃CN-H₂O (2:1, vol/vol) durante 60 min. La curva estándar se construyó a concentraciones crecientes de AA y 6-IL (10-500 pmol). Se realizó un análisis del área bajo la curva y los resultados se expresaron como pmol de AA ó 6-IL/g de tejido.

3.7 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR, CICLO CELULAR Y APOPTOSIS

3.7.1 Análisis de la proliferación celular

3.7.1.1 Conteo celular

Las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células en medio DMEM suplementado con 1% FBS sobre cajas de 6 pozos. Después de 24 horas las células se incubaron con 10, 20, 40 y 100 µM de I- de potasio (KI) y I₂ ó con 0.1, 0.5 y 1.0 µM de 6-IL. Las células control se trataron con 1% de EtOH. Las células se colectaron después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con tripsina al 0.05% y se contaron con un hemocitómetro bajo un microscopio, previamente las células se tiñeron con 0.4% de azul tripano.

3.7.1.2 Ensayo MTT

Para la evaluación citotóxica se usó el ensayo MTT. Brevemente, las células se sembraron en cajas de 96 pozos a una densidad de 5×10^3 células por pozo. Después de 24 h se agregó KI o I₂ (20 μ M) en 200 μ l de medio fresco. 24, 48 ó 72 h después, se adicionó 10 μ l de MTT (5 mg/mL en PBS). Se incubaron por 1 h a 37°C en oscuridad. El medio se aspiró y se adicionaron 100 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO). La absorbancia del colorante formazan se midió a 560 nm usando un lector de placas (ELISA Microplate Reader modelo 680, BioRad). El % de proliferación se calculó usando la siguiente ecuación: %proliferación = [(densidad óptica de las células tratadas/ densidad óptica de las células control)] \times 100 y se ajustó al control. Los resultados se presentan como porcentaje del control.

3.7.2 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Las células se sembraron a una densidad de 15×10^4 células en cajas de 6 pozos durante 24 horas, posteriormente se trataron con 10, 20 y 40 μ M de I₂ ó 0.1, 0.5 y 1.0 μ M de 6-IL. Veinticuatro horas después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS y se despegaron con tripsina al 0.05 %. Las células se centrifugaron a 2500 RPM durante 5 min, el botón celular se resuspendió en 500 μ L de NaCl al 0.9% y se fijó con 1 mL de etanol frío al 90%. Posteriormente, se incubaron con 1 mg/mL de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS, para teñir los núcleos. El contenido de DNA se analizó en un citómetro de flujo Partec 2.0 (Partec, Germany) (Partec, Alemania). Las fases del ciclo celular fueron determinadas usando el software FloMax Cytometer. Los datos fueron expresados como el porcentaje de células en fases G1, S y G2/M del ciclo celular. Las muestras se analizaron por triplicado por ANOVA de una vía y como prueba post hoc Tukey. Los datos se expresan como la media \pm DE.

3.7.3 Determinación de apoptosis y condensación de la cromatina

3.7.3.1 Cuantificación de células muertas por citometría de flujo

Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Con el software FloMax Cytometer las células en sub-G1 ó hipodiploides se cuantificaron y presentamos la media \pm DE del porcentaje de células en sub-G1. Las muestras se analizaron en triplicado por ANOVA de una vía y como prueba post hoc Tukey.

3.7.3.2 Análisis de apoptosis por el ensayo colorimétrico APOPercentage

Este ensayo utiliza un colorante que es selectivamente internalizado y acumulado por células que expresan externamente fosfatidilserina, lo cual es uno de los procesos de iniciación de apoptosis (Denecker et al., 2000). Brevemente, las células se trataron con I₂ y KI (10, 20 y 40 μ M) o con 0.1, 0.1% y 1.0 μ M de 6-IL a diferentes tiempos. Al finalizar las correspondientes incubaciones, se agregó el colorante APOPercentage (10 μ l en 1.5 mL de medio/caja) y se incubó por 30 minutos más. Como primer paso, las células se lavaron y fotografiaron en un microscopio de contraste de fases a 10x. Posteriormente se agregaron 100 μ l del agente de liberación del colorante y su absorbancia se midió a 550 nm usando un lector de placas.

3.7.3.3 Análisis de la fragmentación nuclear por escalera de DNA

Después de la incubación con I₂ (10-40 μ M) y 6-IL (0.1-1.0 μ M), las células (1×10^6 células) tanto adheridas como suspendidas se lisaron con 500 μ L del amortiguador de lisis (0.5 % Tritón X-100, 2 mM EDTA, 5 mM Tris-HCL, pH 8.0) e incubadas a 50°C durante 2 h con 200 μ g/ml de proteinasa K. El DNA se extrajo con Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitado con 0.1 volumen de 0.3 M de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Después se centrifugó a 13.000g, y el botón de DNA se lavó con etanol al 75%. Después se secó y resuspendió en 20 μ L de agua con RNasa A (7,000 U/ml) e incubada durante 2 h a 37 °C. La electroforesis de las muestras de DNA se realizó en un gel de agarosa al 2 % a 60 Volts. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en una cámara de luz ultravioleta (UV).

3.8 ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES DE PROLIFERACIÓN, CICLO CELULAR Y APOPTOSIS POR IMMUNOBLOT

3.8.1 Análisis de PCNA, p53, p21^{waf}-1, Bax, Bcl-2 y caspasa-7 por inmunoblot

Después de los tratamientos, las células se colectaron y se extrajeron proteínas con 100 μ L de amortiguador de lisis (5 mM TRIS pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 % NP-40) y se centrifugaron a 13,000 RPM por 10 min a 4°C. El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Cincuenta a 70 μ g de proteínas se separaron en un gel SDS-poliacrilamida al 12 % y se transfirió a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante 1 hora con 5% de leche libre de grasas en TTBS (TBS/0.05% tween 20). Después de varios lavados con TTBS se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios policlonales contra PCNA, p53, p21^{waf-1}, Bax, Bcl-2, caspasa-7 (fragmento activo) y β -actina. Las diluciones de los anticuerpos fueron de 1:100-1:1000 en 5% de TBS con 5% de leche libre de grasas. Posteriormente, las membranas se lavaron varias veces en TTBS y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa a una dilución de 1:500. La señal se detectó por quimioluminiscencia ECL (Amersham). El análisis densitométrico de las bandas se determinó con el software ImageQuant TL v2005 (Amersham).

3.8.2 Identificación del fragmento apoptótico de PARP-1 y redistribución de AIF

Las células se trataron con 20 μ M de I₂ ó 1.0 μ M de 6-IL por 3, 6, 9, 12 y 24 h. Para remover los núcleos las células se trataron con el amortiguador de lisis con NP-40 (30 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 % NP-40, 1 mM ditioneitol, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil y un cóctel de inhibidores de proteasas) seguida de una centrifugación a 800 g. El sobrenadante contiene las proteínas citosólicas y el botón contiene los núcleos. Las proteínas se cuantificaron por el método Bradford, 20-50 μ g de proteínas nucleares ó citosólicas se utilizaron para la electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% bajo condiciones no reductoras. Las proteínas AIF y PARP1 se detectaron por inmunoblot como se describe arriba.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos representan al menos tres diferentes experimentos hechos en duplicado y están expresados como la media \pm desviación estándar (DE). Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron usando análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y la prueba post hoc de Tukey. Diferencias con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

IV. RESULTADOS

4.1 PARTICIPACIÓN DE NIS Y PDS EN LA CAPTURA DE I₂

4.1.1 Efecto de NIS y PDS en la captura de I⁻ y I₂

La Figura 8, muestra que solamente las células MCF-7 (NIS+) tratadas con 1 μM de AR expresan los RNAs para NIS y PDS, mientras que las MCF-7 (NIS-) sin AR sólo expresan el RNAm para PDS.

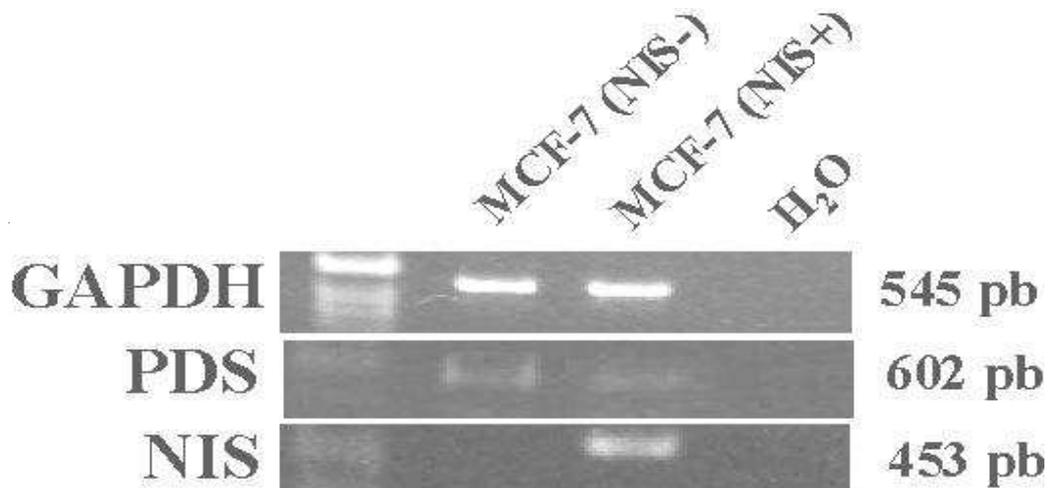


Figura 8. Expresión de los RNAs para NIS y PDS en células MCF-7 con (NIS+) y sin (NIS-) inducción del transportador NIS. Electroforesis representativa de tres experimentos con resultados similares. El RNAm de GAPDH se usó como control interno para propósitos de normalización. Control, H₂O con todos los reactivos de PCR pero sin RT.

La figura 9A, muestra que las células MCF-7 (NIS-) capturan un porcentaje mínimo de I⁻ a los 15 minutos (posiblemente debido a PDS). En contraste las células MCF-7 (NIS+) capturan gradualmente en el tiempo concentraciones crecientes de I⁻. Como control negativo de la captura de I⁻ usamos fibroblastos de ratón NIH3T3, los cuales no expresan PDS y NIS (Tong et al., 1997). Como se esperaba estas células no capturan I⁻ (Figura 9A). Al analizar la captura de I₂ los datos muestran que independientemente de la presencia o no de NIS, las células MCF-7 (NIS+ ó NIS-) captan 5 veces más I₂ que I⁻ con un pico entre los 5 y 15 minutos. Aunque después de 60 minutos sólo permanece un 10 % (Figura 9B). Resultados similares se obtuvieron con las células

MDA-MB 231 (datos no mostrados). En contraste, las células NIH3T3 capturan menos I_2 y este es liberado completamente a los 60 min (Figura 9B).

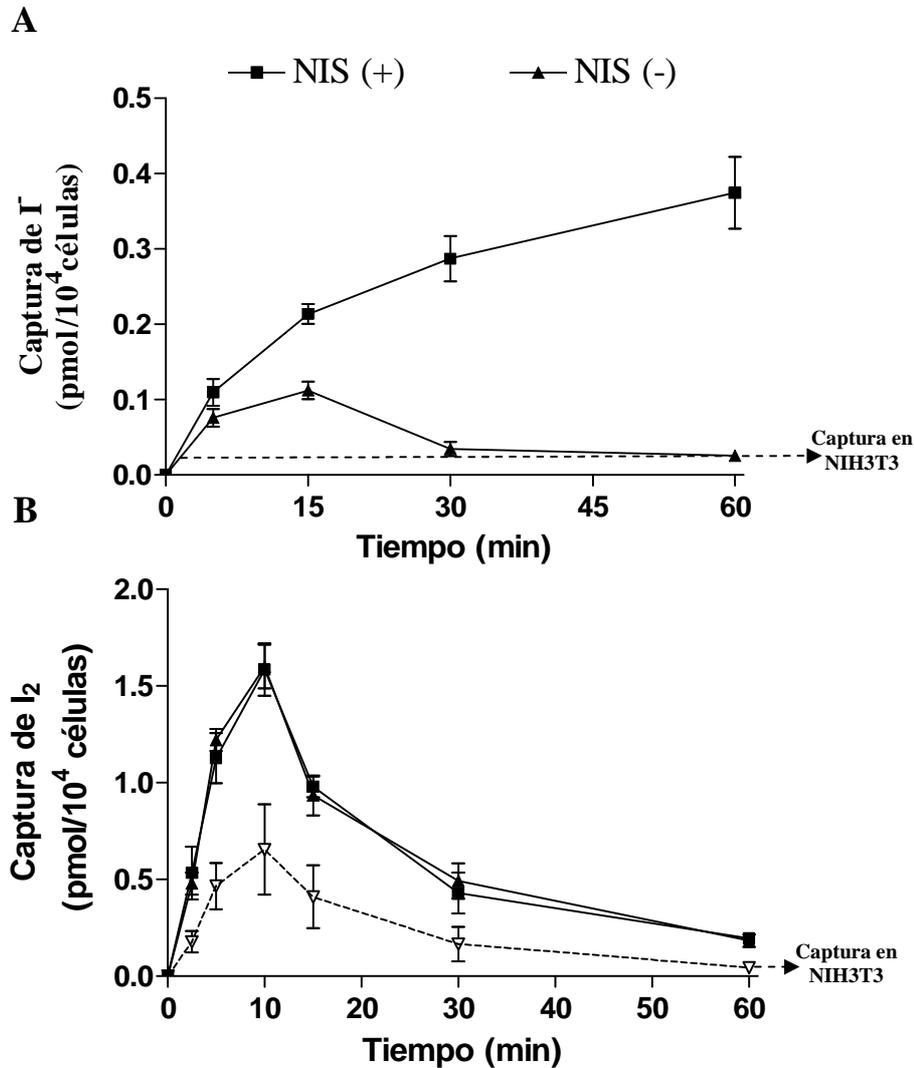


Figura 9. Captura de diferentes formas de radioyodo en células MCF-7 y NIH3T3. Las células MCF-7 se preincubaron 48 h antes con 1 μM de AR (NIS+) y sin 1 μM de AR (NIS-) posteriormente se trataron con 1.25 mCi/mmol de $^{125}\text{I}^-$ ó $^{125}\text{I}_2$ en buffer HBSS. **A**, Captura de I^- . **B**, Captura de I_2 . Los valores están expresados como la media \pm DE. n=5.

4.1.2 La captura de I_2 no depende de los transportadores NIS y PDS

Para analizar si NIS y PDS participan en la captura de I_2 , utilizamos las células MCF-7 (NIS+) y las tratamos con diferentes dosis de DIDS (inhibidor de PDS) ó KClO_4 (bloqueador de NIS). La Figura 10A, muestra una inhibición en la captura de I^- entre el 50 y 70% con dosis de

100 a 1 mM de DIDS, igualmente con 30 y 50 μM de KClO_4 se inhibe más del 50 % de la captura de I^- . Con ambos inhibidores la captura de I^- se inhibió un 80 %, en contraste, la captura de I_2 no se modifica con ninguno de los inhibidores (Figura 10B).

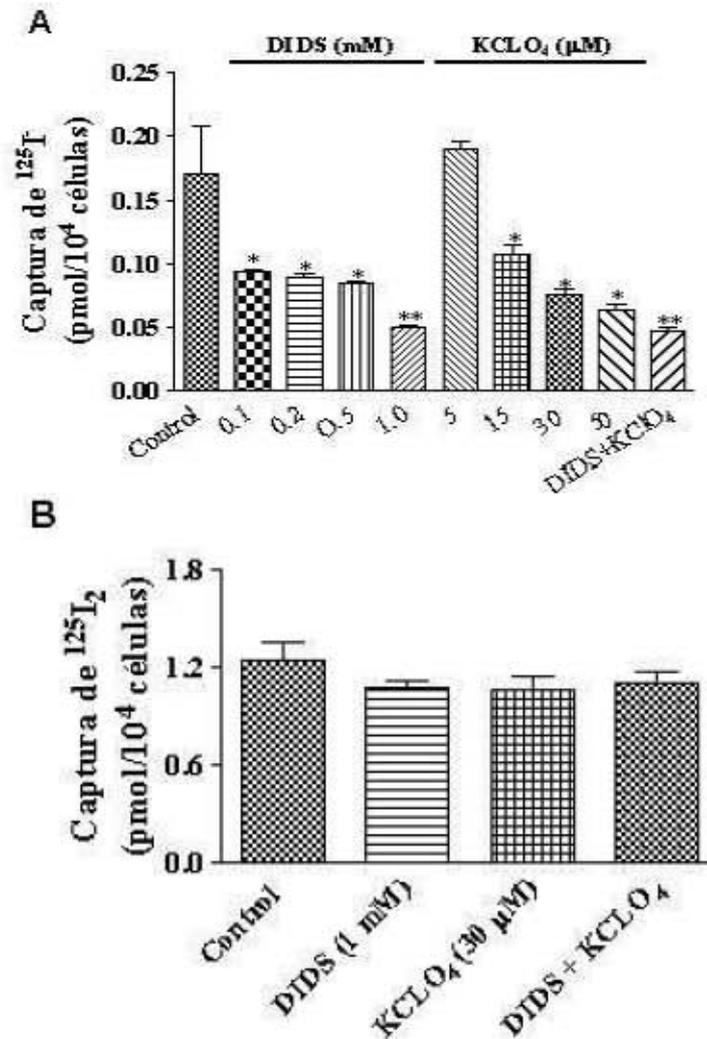


Figura 10. Efecto de inhibidores de NIS y PDS en la captura de I^- y I_2 en células MCF-7 (NIS+). Las células se trataron por 15 min con 1.25 mCi/mmol de $^{125}\text{I}^-$ ó $^{125}\text{I}_2$ más los inhibidores a las concentraciones indicadas. **A**, dosis respuesta de DIDS y KClO_4 en la captura de $^{125}\text{I}^-$; **B**, efecto de DIDS y KClO_4 en la captura de $^{125}\text{I}_2$. Se ilustra $\bar{X} \pm \text{DE}$. n=5 cajas. *, p< 0.01; **, p<0.00 vs control.

4.2 LA CAPTURA DE I₂ DEPENDE DE UN TRANSPORTE POR DIFUSIÓN FACILITADA EN CÉLULAS MCF-7

4.2.1 Caracterización de la captura de I₂ en células MCF-7

Para dilucidar el tipo de transporte que utiliza el I₂, las células se trataron con 1.25 mCi/mmol de ¹²⁵I₂ más concentraciones crecientes de I₂ (0.1 a 10 μM) y a los 5 min se cuantificó la captura. La figura 11A muestra una linealidad hasta 2 μM de sustrato alcanzando la saturación a partir de 5 μM. Las constantes aparentes de Michaelis Menten se obtuvieron a partir de graficar los dobles recíprocos (Lineweaver-Burke). Los datos mostraron una K_m de 0.91 μM y una V_{max} de 1.13 pmol/min/10⁴ (Figura 11B).

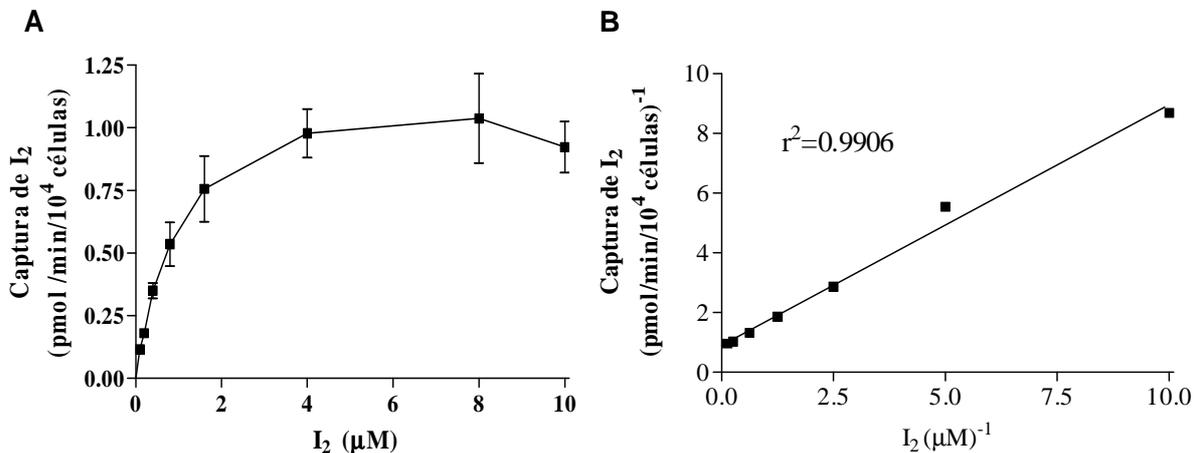


Figura 11. Dependencia de la captura inicial sobre la concentración extracelular de I₂ en células MCF-7 sin AR. Las células se incubaron a 37°C por 5 minutos con 500 μL de HBSS conteniendo 1.25 mCi/mmol de ¹²⁵I₂ más las concentraciones indicadas de I₂ frío. El ¹²⁵I₂ intracelular se midió en un contador gamma y normalizado al número celular. **A**, cinética de captura de I₂. **B**, Gráfica dobles recíprocos Lineweaver-Burk. Se ilustra media ± DE. n=3 cajas por duplicado.

4.2.2 La captura de I₂ no requiere de energía y sodio

Para analizar si el transporte de I₂ era dependiente de ATP y Na⁺, utilizamos azida de sodio, (un inhibidor del transporte de electrones mitocondrial, el cual, depleta los niveles de ATP; (Harvey et al., 1999) y timerosal (un inhibidor de la ATPasa de Na⁺/K⁺; Lewis y Bowler, 1983). Los resultados muestran que con 10 mM de azida de sodio o timerosal se inhibe aproximadamente el 50% de la captura de ¹²⁵I₂ en células NIS⁺ (Figura 16). En contraste, el

transporte de I_2 no se afectó con el tratamiento de azida de sodio o timerosal (10 mM) (Figura 12).

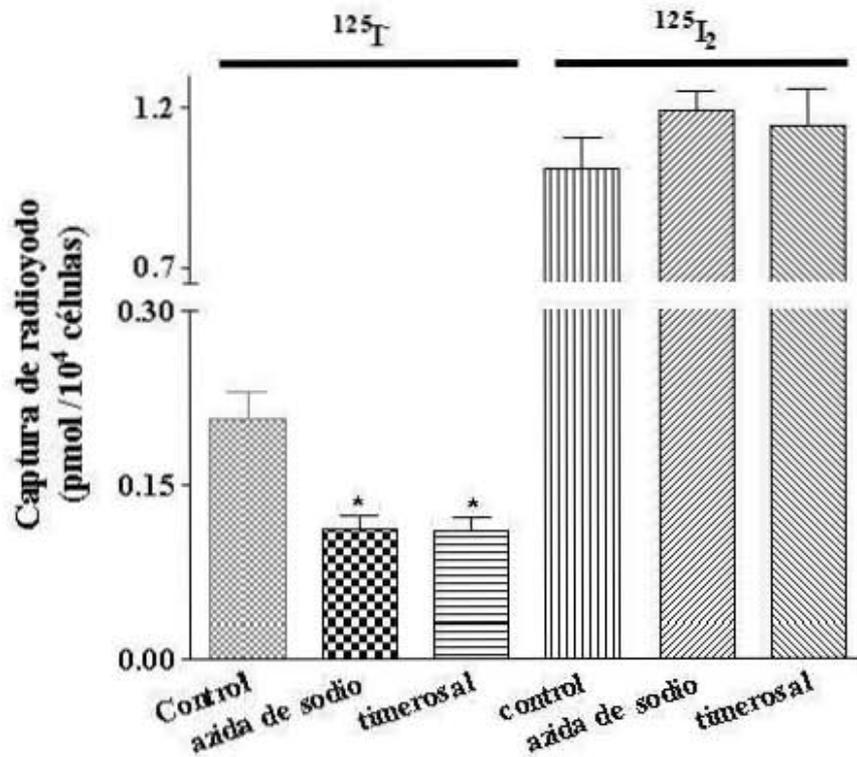


Figura 12. Efecto de Inhibidores metabólicos en la captura de radioyodo en células MCF-7 con y sin AR. Las células se incubaron con 10 mM de azida de sodio o timerosal por 30 min. Después se incubaron con 1.25 mCi/mmol de ^{125}I o $^{125}I_2$ a 37°C por 15 min. La captura de radioyodo se analizó en un contador gamma. Se ilustra la media \pm DE. n=3 cajas por duplicado.* $p < 0.05$ vs células control.

Para analizar si la captura depende de Na^+ , se hizo una substitución equimolar de LiCl por NaCl. Los resultados muestran aproximadamente un 80 % de inhibición en la captura de ^{125}I (Figura 13). En contraste, la captura de $^{125}I_2$ se inhibe sólo parcialmente (Figura 13).

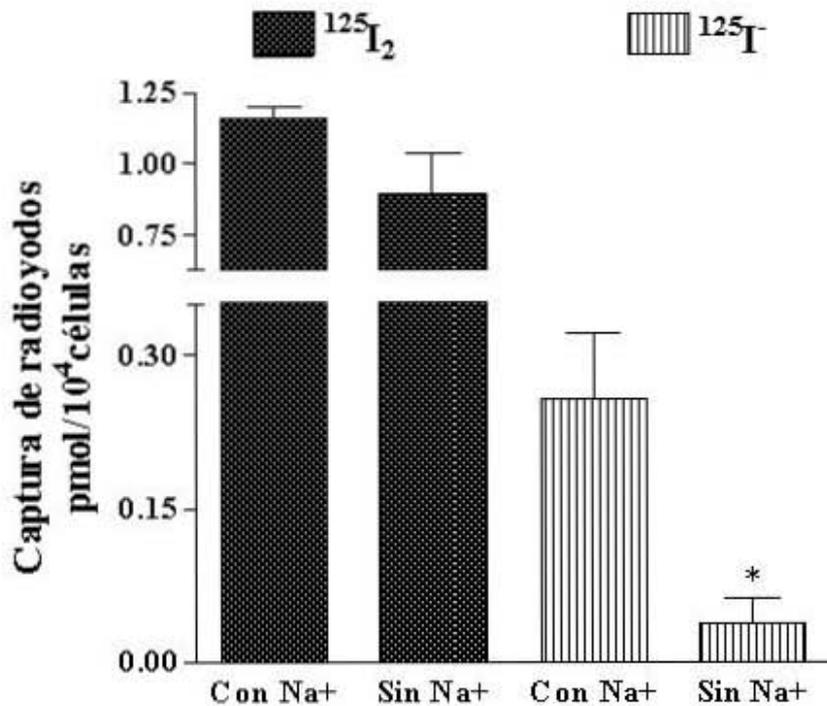


Figura. 13. Efecto de Na⁺ en la captura de radioyodo en células MCF-7. Las células se incubaron por 15 min en amortiguador KRB-Na⁺ o KRB-sin Na⁺. Se agregó 1.25 mCi/mmol de ¹²⁵I₂ a 37°C por 15 min. Los resultados se expresaron en pmol/ número de células al momento del ensayo. Se ilustra media ± DE. n=3.* p<0.05 vs células control.

4.2.3 La captura de I₂ depende de la síntesis de proteínas

Para conocer si el transporte de I₂ depende de la síntesis de RNA ó proteínas, se utilizaron 5 µg/ml de α-amanitin (inhibidor de síntesis de RNA) ó 5 µg/ml de cicloheximida (CHX) (inhibidor de la síntesis de proteínas) en células MCF-7 (NIS⁻). Los resultados muestran una inhibición de más de un 50% en la captura de I₂ a los 60 y 120 minutos después de haber agregado CHX (Figura 14). Mientras que la captura de I₂ no se afectó al inhibir la síntesis de RNA con α-amanitina (Figura 14). Las concentraciones usadas de α-amanitin y CHX no afectaron la viabilidad celular como ya se había reportado (Rillema y Hill, 2003).

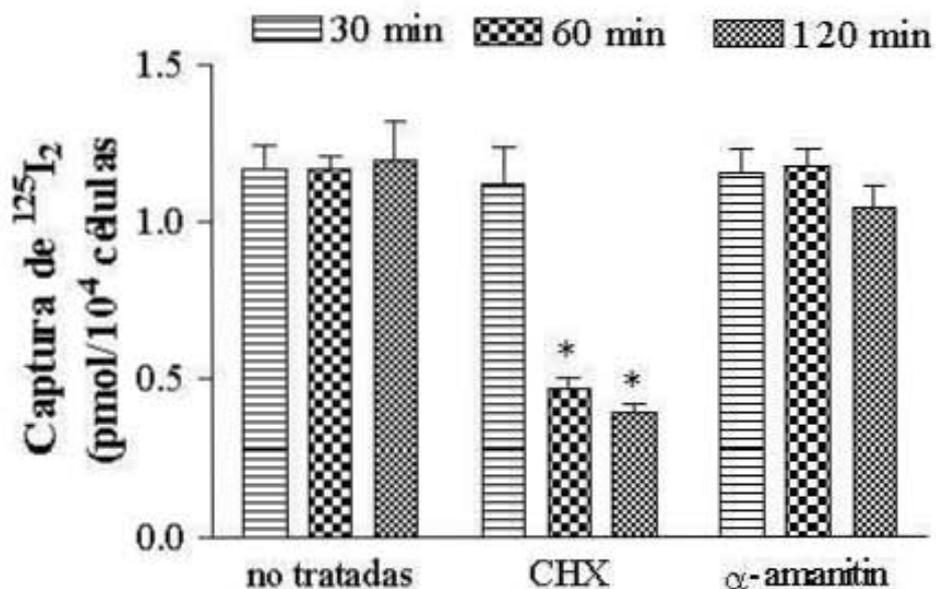


Figura 14. Efecto de la síntesis de RNA y proteínas en la captura de I₂ en células MCF-7 sin AR. Las células MCF-7 se incubaron previamente con 5µg/ml de α-amanitin ó cicloheximida (CHX) a los tiempos indicados. Después las células se incubaron con 1.25 mCi/mmol de ¹²⁵I₂ a 37°C por 15 min. La radiactividad se determinó con un contador gamma. Los resultados se expresaron en pmol/ número de células al momento del ensayo. Se ilustra la media ± DE. n=3 cajas por duplicado.* p<0.05 vs células control.

4.2.4 Organificación de I₂ en lípidos y proteínas

Para analizar la formación de moléculas orgánicas yodadas (organificación del I₂ en lípidos y proteínas) y si esta organificación es dependiente de la lactoperoxidasa (LPO), se trató a las células MCF-7 y MDA-MB 231 con y sin inhibidor de peroxidasas propil-tiouracilo (PTU). Después de administrar ¹²⁵I₂ y ¹²⁵I⁻, se colectaron las células a los 15 ó 60 minutos y se precipitaron las proteínas con TCA. Los lípidos se extrajeron por el método de Bligh y Dyer (1959). La figura 15 muestra que el tratamiento con ¹²⁵I₂ genera un 6-8 % de marca radiactiva en proteínas y un 2.5- a 3.5 % en lípidos, sin modificaciones con la adición de PTU. En contraste, el tratamiento con ¹²⁵I⁻ se acompañó de una muy escasa organificación (aprox. 1.5 %) en lípidos y despreciable en proteínas.

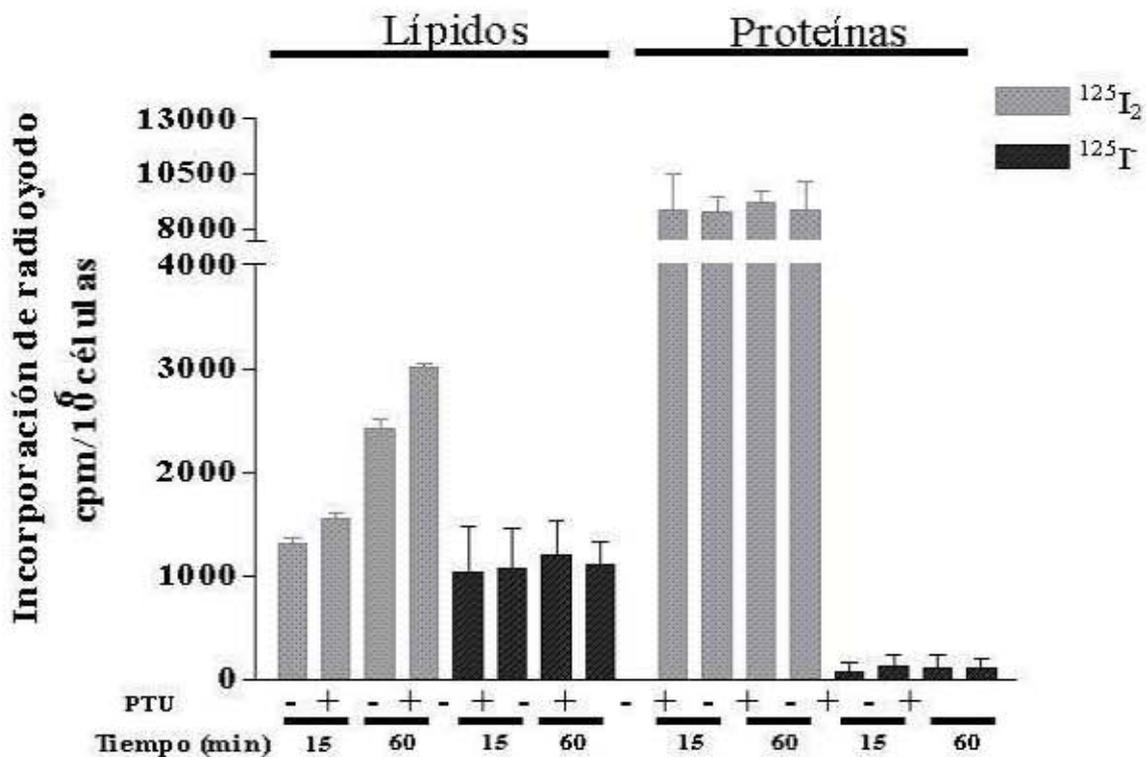


Figura 15. Incorporación de I vs I₂ en proteínas y lípidos de células MCF-7. Las células se incubaron con y sin 100 mM de PTU (inhibidor de peroxidasas) antes de adicionar 1.25 mCi/mmol de ¹²⁵I₂ o ¹²⁵I por 15 y 60 minutos a 37°C. Las proteínas y lípidos se extrajeron como se indica en material y métodos. Se ilustra la media ± DE. n=3 cajas por duplicado.

Las proteínas radioyodadas se analizaron por autoradiografía del gel de poliacrilamida. Los resultados muestran proteínas yodadas de un peso molecular aproximado de 18-21 kDa, sólo en las células MCF-7 tratadas con ¹²⁵I₂. En contraste, no se observaron proteínas yodadas con I (Figura 16). Al separar por TLC ascendente los lípidos junto con los estándares AA, 6-IL y 6-IL marcada con ¹²⁵I₂ (6-¹²⁵IL), los resultados muestran diferentes lípidos yodados con el tratamiento con ¹²⁵I₂, y algunos coinciden con el factor de retención (rf) de 0.75 para la 6-IL (Figura 17A). La autoradiografía del mismo cromatofolio con los lípidos separados, muestra que efectivamente hay lípidos radioyodados que coemigran con la 6-¹²⁵IL (Figura 17B). En contraste, el tratamiento con I no generó lípidos yodados (Figura 17).

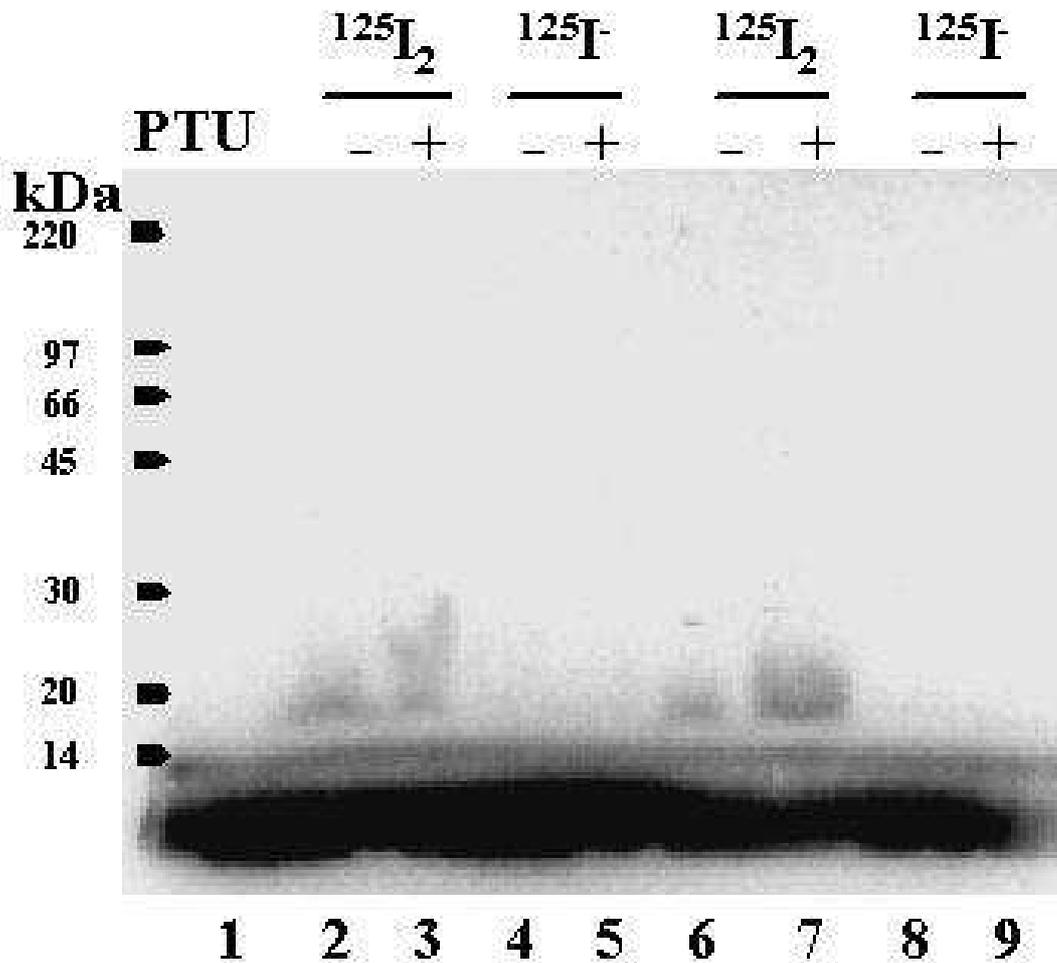


Figura 16. Análisis de proteínas yodadas por SDS-PAGE en células MCF-7. Las células se incubaron con y sin 100mM de PTU (inhibidor de peroxidasas) antes de adicionar 1.25 mCi/mmol de $^{125}\text{I}_2$ ó $^{125}\text{I}^-$ por 15 ó 60 minutos. Las proteínas radioyodadas se detectaron por autoradiografía. **1**, marcador de peso molecular; **2, 3, 4 y 5** proteínas yodadas a los 15 minutos; **6, 7, 8 y 9** proteínas yodadas a los 60 minutos. Las figuras son representativas de 3 experimentos con resultados similares.

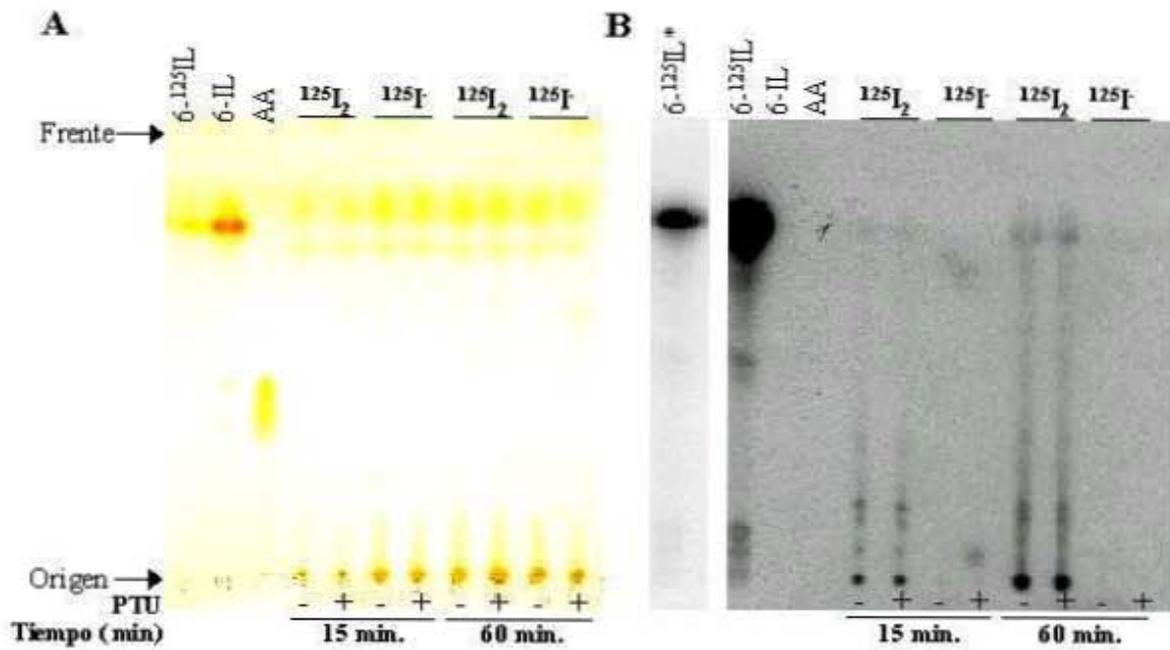


Figura 17. TLC ascendente de lípidos yodados de células MCF-7 tratadas con $^{125}\text{I}^-$ vs $^{125}\text{I}_2$. Las células se incubaron con y sin 100 mM de PTU (inhibidor de peroxidasas) antes de adicionar 1.25 mCi/mmol de $^{125}\text{I}_2$ ó $^{125}\text{I}^-$ por 15 ó 60 minutos. **A**, Cromatofolio representativo con lípidos revelados con yodo sublimado. **B**, autoradiografía del mismo cromatofolio expuesto por 15 h. El experimento es representativo de tres diferentes ensayos con similares resultados. 6- $^{125}\text{IL}^*$, autoradiografía de la 6- ^{125}IL del mismo cromatofolio expuesto por 6 h. 6-IL marcada radiactivamente (6- ^{125}IL).

4.3 PRESENCIA DE 6-IL EN LÍPIDOS DE GLÁNDULA MAMARIA TUMORAL TRATADA CRÓNICAMENTE CON I₂

4.3.1 Formación de lípidos yodados en glándula mamaria tratada con ¹²⁵I₂

La figura 18 muestra la presencia de lípidos yodados en la glándula mamaria virgen después de una inyección única de 50 µCi/rat de ¹²⁵I₂ ó ¹²⁵I⁻. Los resultados indican que la incorporación de ¹²⁵I₂ en la fracción lipídica es de 4 a 6 veces más que con I⁻ (5-8 % vs 1% respectivamente).

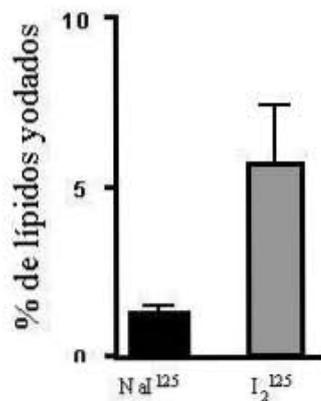


Figura 18. Identificación de radioyodos en lípidos de glándula mamaria de rata. Se aislaron los lípidos con cloroformo:metanol:agua (técnica de Bligh y dyer, 1956). n=3.

4.3.2 Cuantificación de AA y 6-IL en lípidos de glándula mamaria normal y tumoral

Para la identificación del AA y 6-IL por HPLC, primero separamos los estándares de AA y 6-IL. Las figuras 19 A y B, muestra los cromatogramas de los estándares con un tiempo de retención de 13 min para el AA (50 nmoles), y de 21 min para la 6-IL (35 nmoles). En la tabla 2 se observa la cuantificación de AA y 6-IL, mostrando altas concentraciones de AA (3.7 veces más) en los tumores mamaríos vs glándula mamaria normal. Además, sólo en los lípidos de GM tratada con I₂ se detectó la 6-IL.

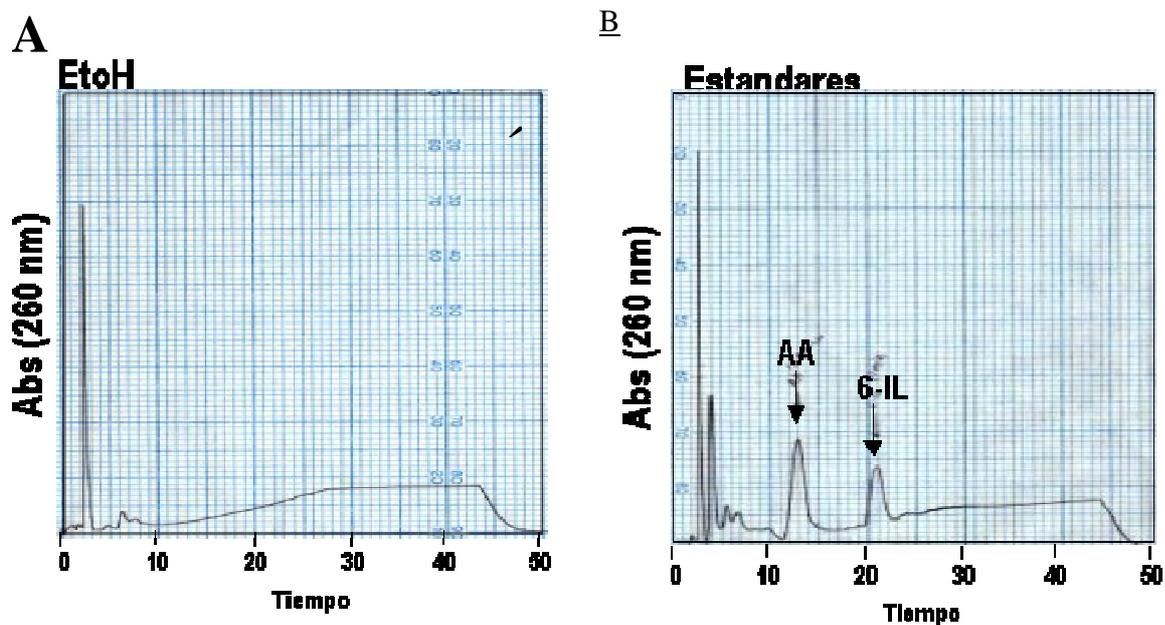


Figura 19. Histograma de estándares de AA y 6-IL. Se aislaron los lípidos con cloroformo:metanol:agua (técnica de Bligh y dyer, 1956). 50 nmol de AA y 35 nmol de 6-IL se inyectaron al HPLC.A., n=2.

Tabla 2. Concentración de AA y 6-IL en glándula mamaria normal y tumoral tratada crónicamente con ó sin I₂.

	AA (nmol/g de tejido)	6-IL (nmol/g de tejido)
GM control	1.70 ± 0.5	-----
GM + I₂	1.54 ± 0.3	0.13 ± 0.1
Tumor control	6.22 ± 0.8	-----
Tumor + I₂	5.31 ± 1.0	1.92 ± 0.3

A partir de las 5 semanas de edad las ratas recibieron en el agua de beber I₂ al 0.05%. Dos semanas después recibieron una sola dosis de MNU (50 mg/ kg de peso) y los tratamientos se continuaron durante 16 semanas. Los lípidos se extrajeron a partir de 500 mg de GM por la técnica de Blig y Dyer (1956). AA y 6-IL se cuantificaron por HPLC. Se presenta la media ± DE. n= 4-5.

4.4 EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL I₂ Y 6-IL EN CÉLULAS MCF-12F, MCF-7 Y MDA-MB 231

4.4.1 Efecto del I₂, KI y 6-IL en la proliferación celular

La figura 20 A muestra que se requieren dosis altas de I₂ (40-100 µM) para ejercer un efecto antiproliferativo en las células humanas del epitelio mamario normal (MCF-12F). Los datos muestran que se requieren de 40 a 80 veces menos 6-IL para ejercer un efecto similar. Además en las células de cáncer mamario MCF-7 y MDA-MB 231, el efecto antiproliferativo se observa desde dosis bajas de I₂ (10 y 20 µM), mientras que con 6-IL se observa un efecto antiproliferativo dosis-respuesta desde 0.1 µM. Es decir se requieren de 20 a 40 veces menos 6-IL para tener un efecto similar que con 10 µM de I₂ (Figura 20 B y C). En la figura 21, se observa que el tratamiento con 20 µM de I₂ y 0.5 µM de 6-IL disminuyen la proliferación celular desde las primeras 24 horas de tratamiento, encontrándose un efecto dependiente del tiempo en las tres líneas celulares (MCF-12F, MCF-7 y MDA-MB 231) (Figura 21 A, B y C). Resultados similares se obtuvieron con el ensayo de citotoxicidad con MTT en las tres líneas celulares (Figura 22 A, B y C).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), una proteína auxiliar de la polimerasa delta, juega un papel crítico en la regulación del ciclo celular, replicación y reparación del DNA. Esta proteína se ha usado como un marcador de proliferación celular, debido a que arroja resultados similares cuando se utilizan otros marcadores como ciclina D1 ó incorporación de BrdU (Ip et al., 2000). Los resultados indican que el tratamiento con 20 µM de I₂ a las 24 horas de tratamiento causa una inhibición significativa en la expresión de PCNA en las células tumorales MCF-7 y MDA-MB 231, a diferencia de las células normales MCF-12F donde sólo hay tendencia a disminuir (Figura 23). El tratamiento con 0.5 µM de 6-IL inhibe la expresión de PCNA en las tres líneas celulares (Figura 23). Estos resultados corroboran que el I₂ y 6-IL tienen un efecto antiproliferativo en las tres líneas celulares.

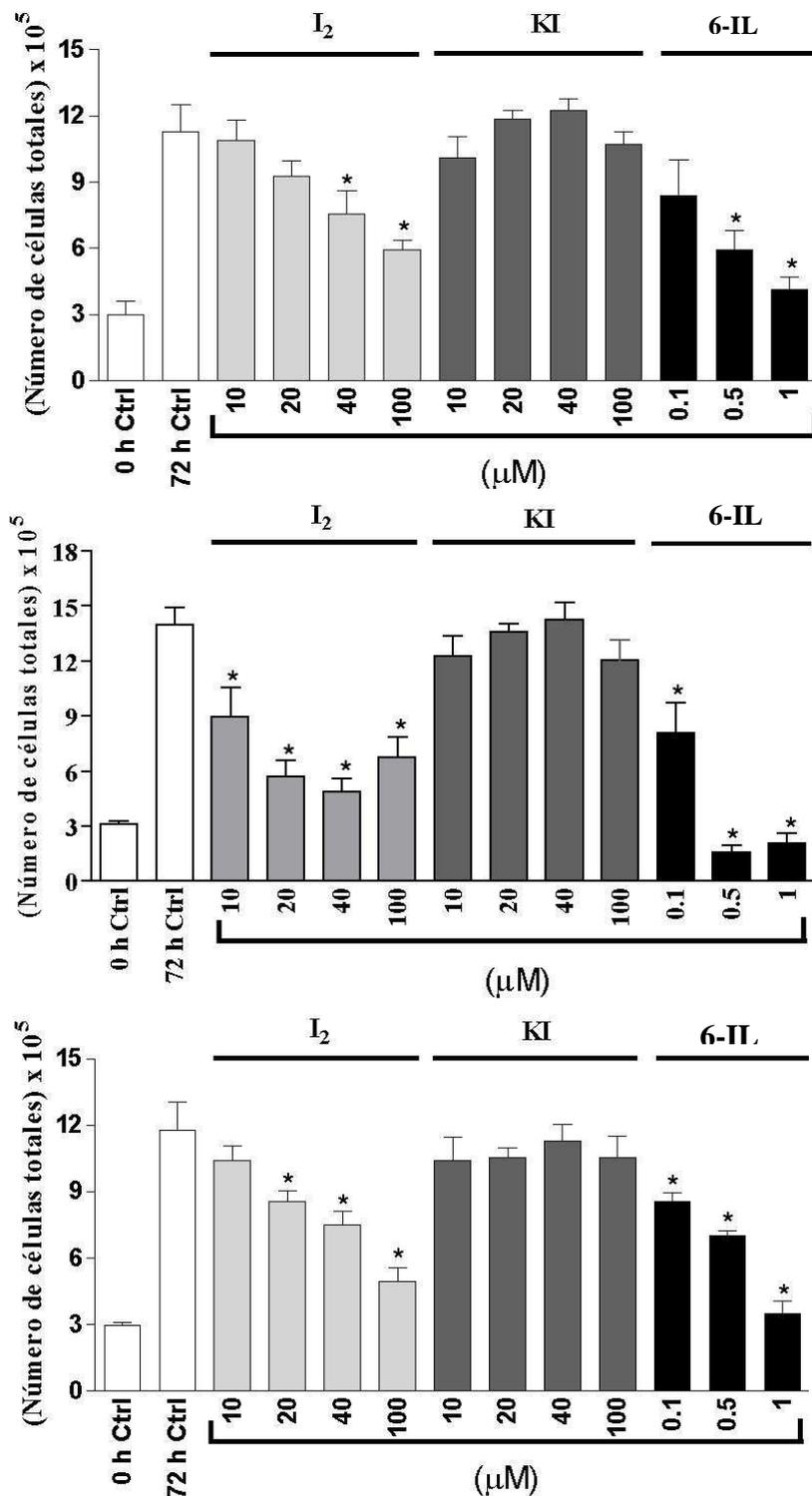


Figura 20. Efecto del I₂, KI y 6-IL en la proliferación celular. Las células se trataron con diferentes dosis de KI, I₂ y 6-IL durante 72 h, posteriormente se colectaron las células adherentes y no adherentes. Posteriormente se contaron en un hemocitómetro. Células **A**, MCF-12F; **B**, MCF-7; **C**, MDA-MB 231. Se ilustra la media \pm DE. n=3. * P<0.05.

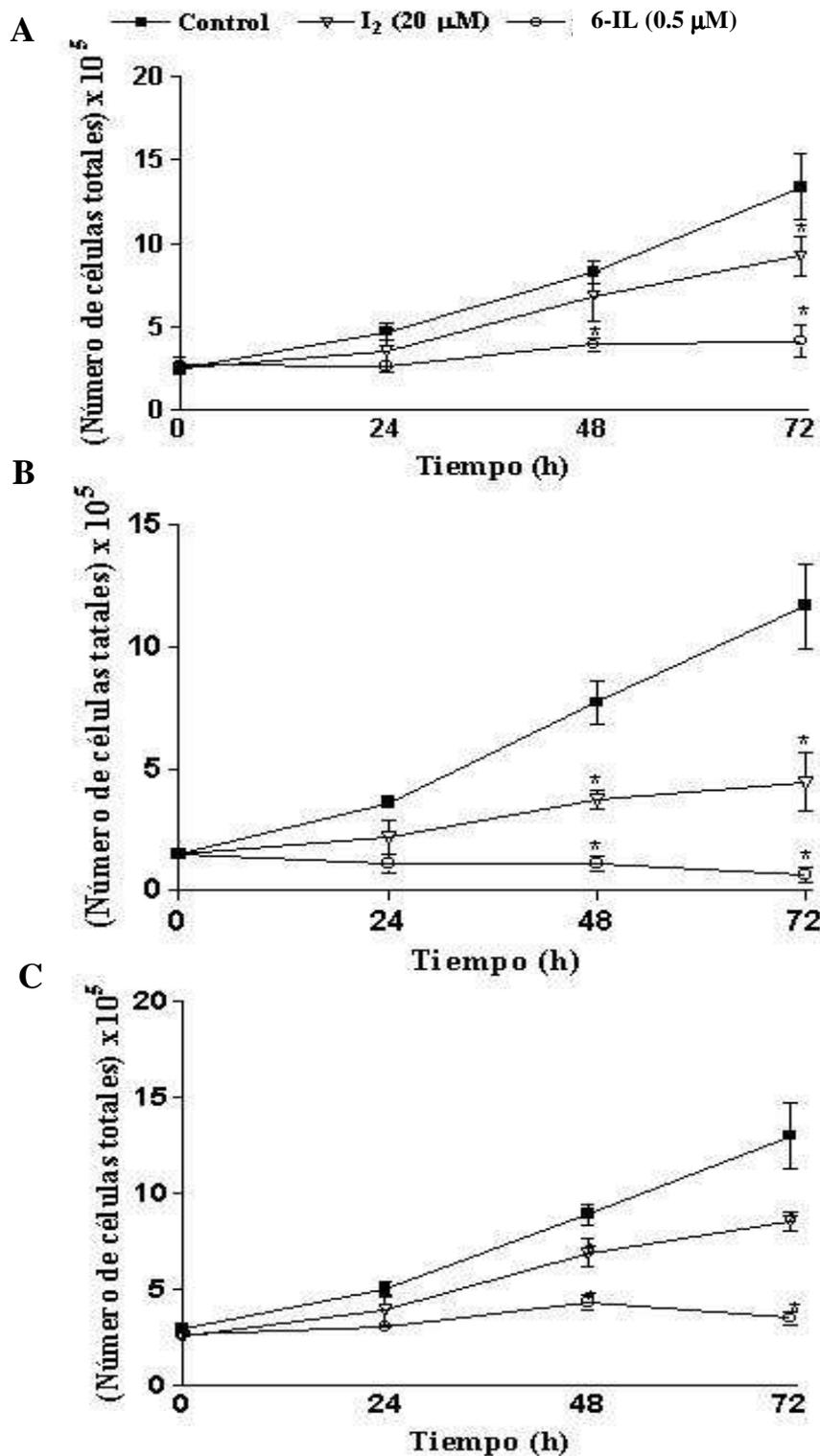


Figura 21. Efecto tiempo dependiente del I₂ y 6-IL en la proliferación celular. Las células se trataron con 20 μM de I₂ y 0.5 μM de 6-IL durante los tiempos indicados, posteriormente se colectaron y se contaron en un hemocitómetro. Células **A**, MCF-12F; **B**, MCF-7; **C**, MDA-MB 231. Se ilustra media ± DE. n=5.

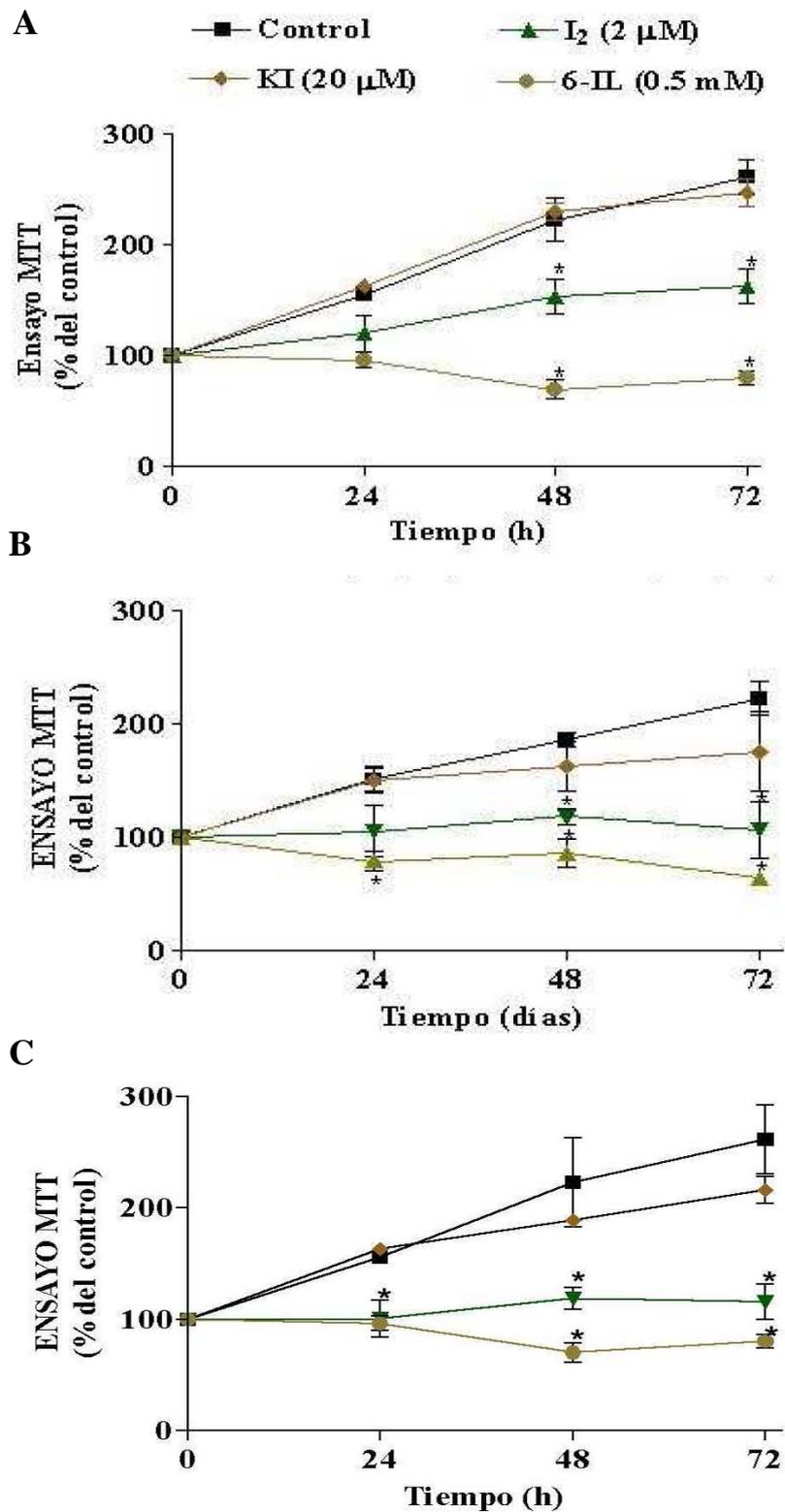


Figura 22. Efecto citotóxico del I₂ y 6-IL . Las células se trataron con 20 μM de I₂ ó KI y 0.5 μM de 6-IL durante los tiempos indicados. Después se colectaron como lo indica material y métodos para el ensayo MTT. Células **A**, MCF-12F; **B**, MCF-7; **C**, MDA-MB 231. Se ilustra media ± DE. n=5.

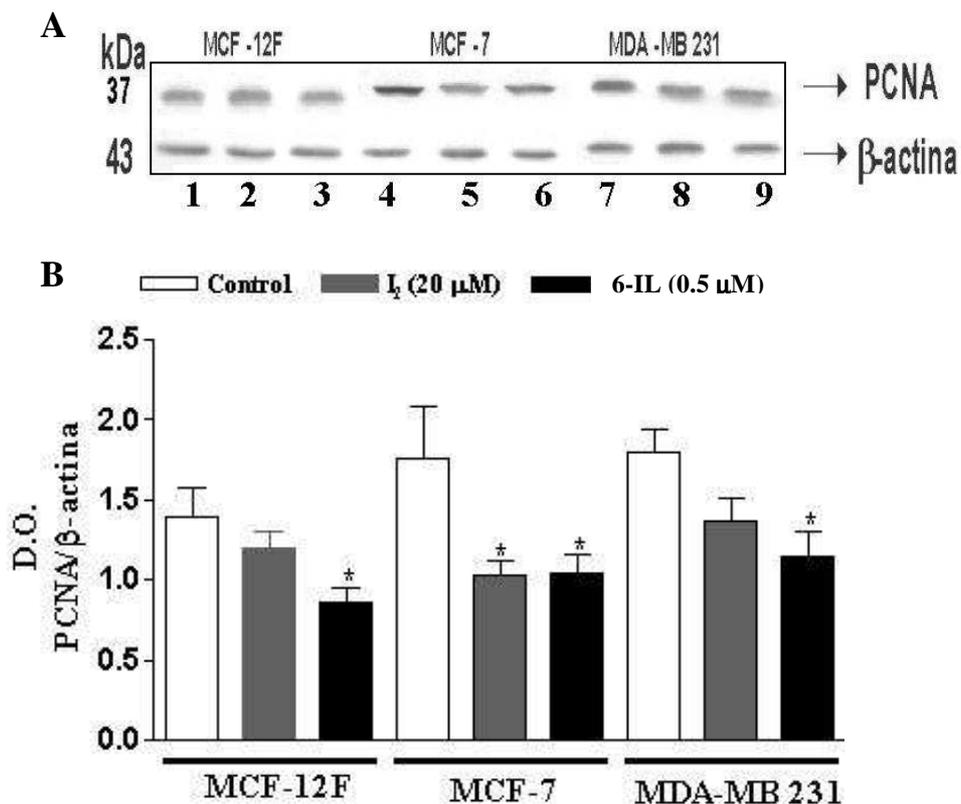


Figura 23. Efecto del I_2 y 6-IL en la expresión de PCNA. Las células se trataron con 20 μ M de I_2 y 0.5 μ M de 6-IL durante 24 h, posteriormente se colectaron las proteínas totales y se separaron en un gel SDS-PAGE al 12%. **A**, inmunoblot representativo para PCNA, β -actina se usó como control de carga de proteínas, 1, 4 y 7 control, 2, 5 y 8 tratadas con 20 μ M I_2 ; 3, 6 y 9 tratadas con 0.5 μ M de 6-IL; **B**, Análisis densitométrico normalizado con los niveles de β -actina. Las células control se trataron con EtOH. Se ilustra media \pm DE. $p < 0.05$. $n=3$.

4.5 EFECTO DEL I₂ Y 6-IL EN CICLO CELULAR

4.5.1 I₂ y 6-IL inducen arresto celular

Mediante citometría de flujo analizamos qué fases del ciclo celular están afectadas con I₂ (10, 20 y 40 µM) y 0.1, 0.5 y 1.0 µM de 6-IL. Los resultados en la figura 24 A, muestra que los tratamientos con I₂ incrementan significativamente la población celular en G1, y la disminuyen en las fases S y G2/M, este efecto fue dosis respuesta en las células MCF-12F. En las células MCF-7 los tratamientos con I₂ ejercen un aumento en la población celular en G2/M, mientras que en la fase S no hubo cambios significativos, este arresto celular fue dosis respuesta (Figura 24 B). En contraste, el tratamiento con I₂ incrementó la población en G1 y la disminuyó en las fases S y G2/M en las células MDA-MB 231 (Figura 24 C).

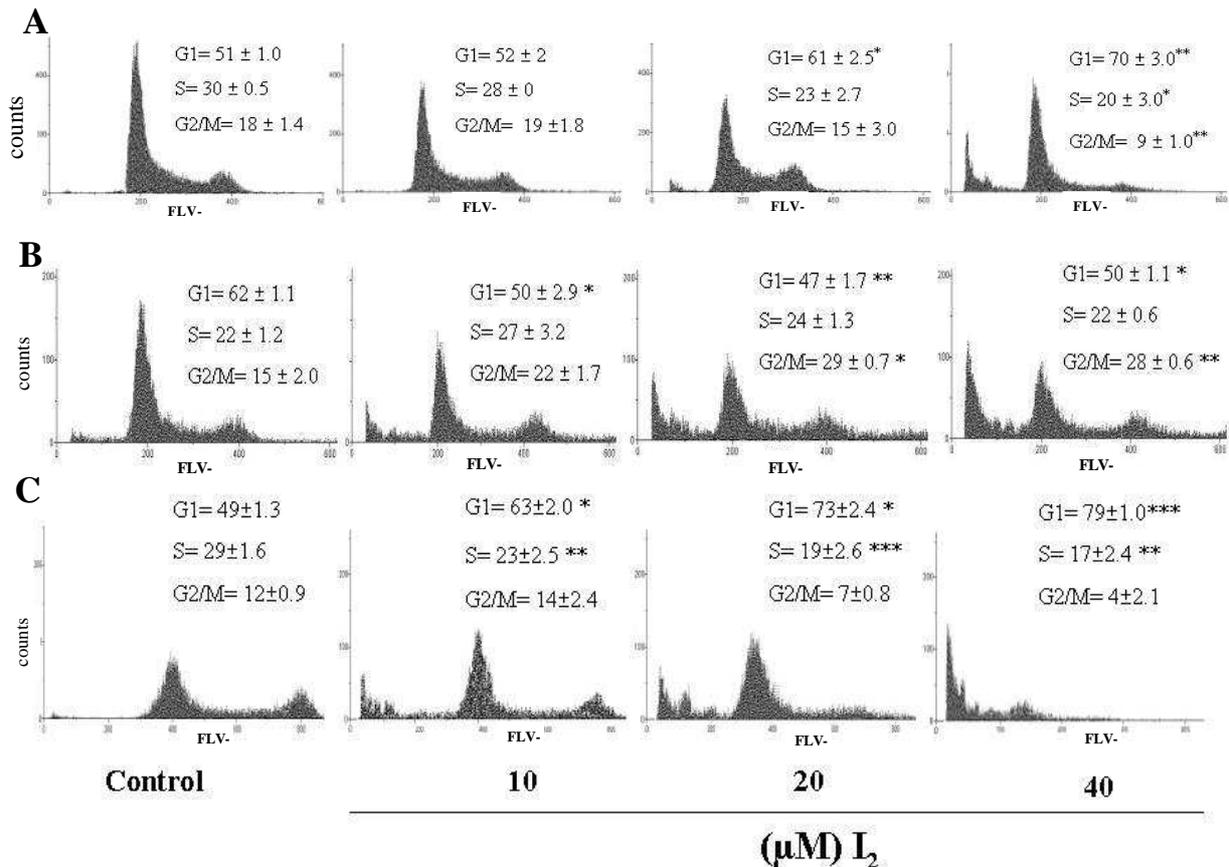


Figura 24. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo en células tratadas con I₂. El porcentaje de células en las diferentes fases se calculó usando el programa FloMax. Células; **A**, MCF-12F; **B**, MCF-7; **C**, MDA-MB 231. Los histogramas muestran la media±DE. * P<0.01 ó ** P<0.001 vs control. n=3.

En células MCF-7 los tratamientos con 6-IL causan arresto celular en G2/M, mientras que en las MDA-MB 231 se arrestan en G1 (Figura 25 B y C). En conclusión, estos resultados demuestran que el efecto antiproliferativo del I₂ y 6-IL involucra arresto del ciclo celular en las tres líneas celulares.

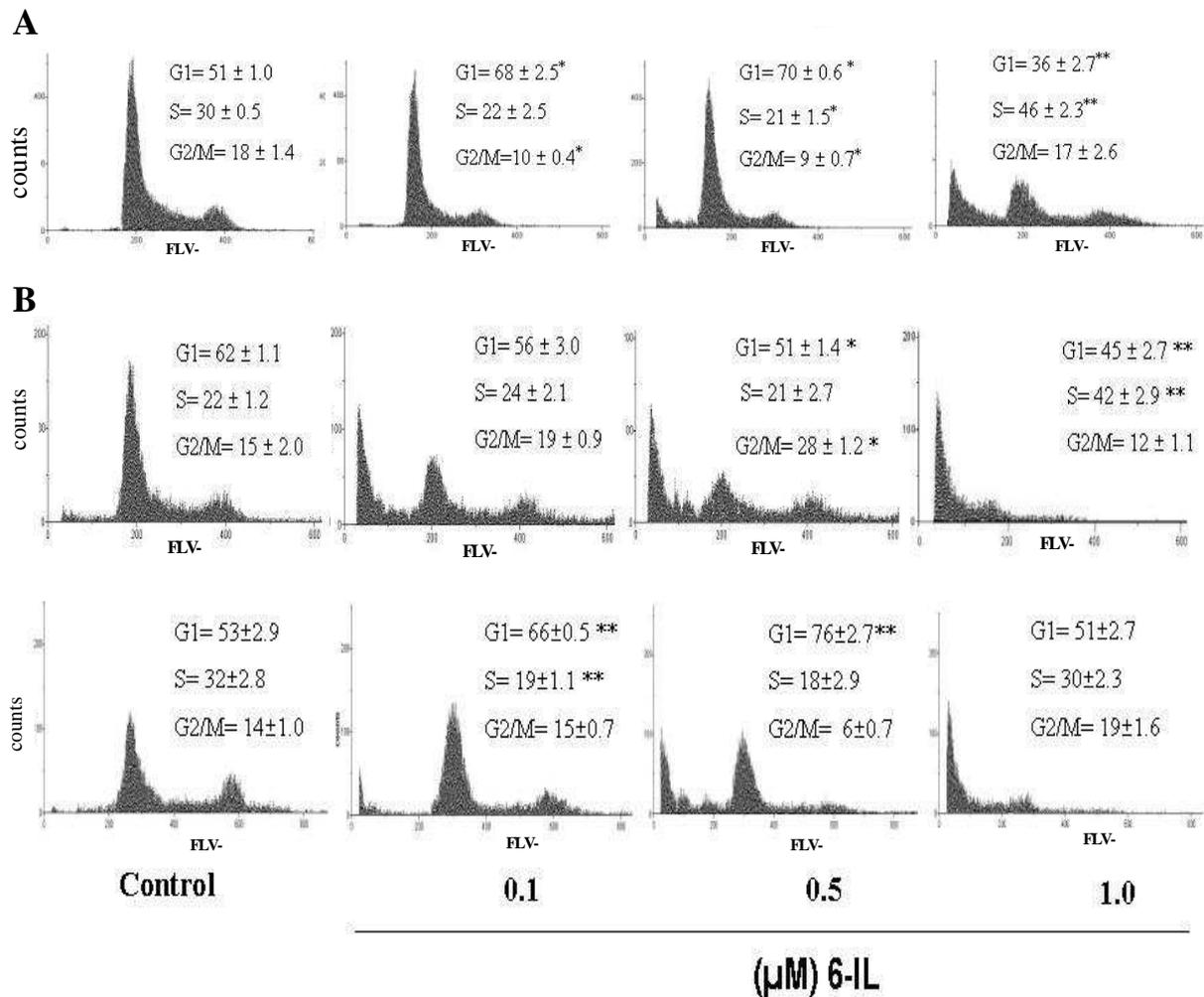


Figura 25. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo en células tratadas con 6-IL. El porcentaje de células en las diferentes fases se calculó usando el programa FloMax. Células; **A**, MCF-12F; **B**, MCF-7; **C**, MDA-MB 231. Los histogramas muestran la media ± DE. * P < 0.01 ó ** P < 0.001 vs control. n = 3.

4.5.2 p53 y p21^{Waf-1} participan en el arresto inducido con I₂ y 6-IL

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con I₂ y 6-IL inhibe el crecimiento celular y arresta a las células en las fases G1 ó G2/M del ciclo celular. El gen supresor de tumores p53, puede regular la transición de G1 ó G2/M al incrementar la expresión de p21^{Waf-1}, la cual secuestra las cdks en el citoplasma, regulando la transición en las diferentes fases del ciclo celular (Bunz et al., 1998). El análisis por inmunoblot muestra que efectivamente los tratamientos con 20 µM de I₂ ó 0.5 µM de 6-IL, incrementan la expresión de p53 y p21 desde las 24 horas en células MCF-7 (Figura 26).

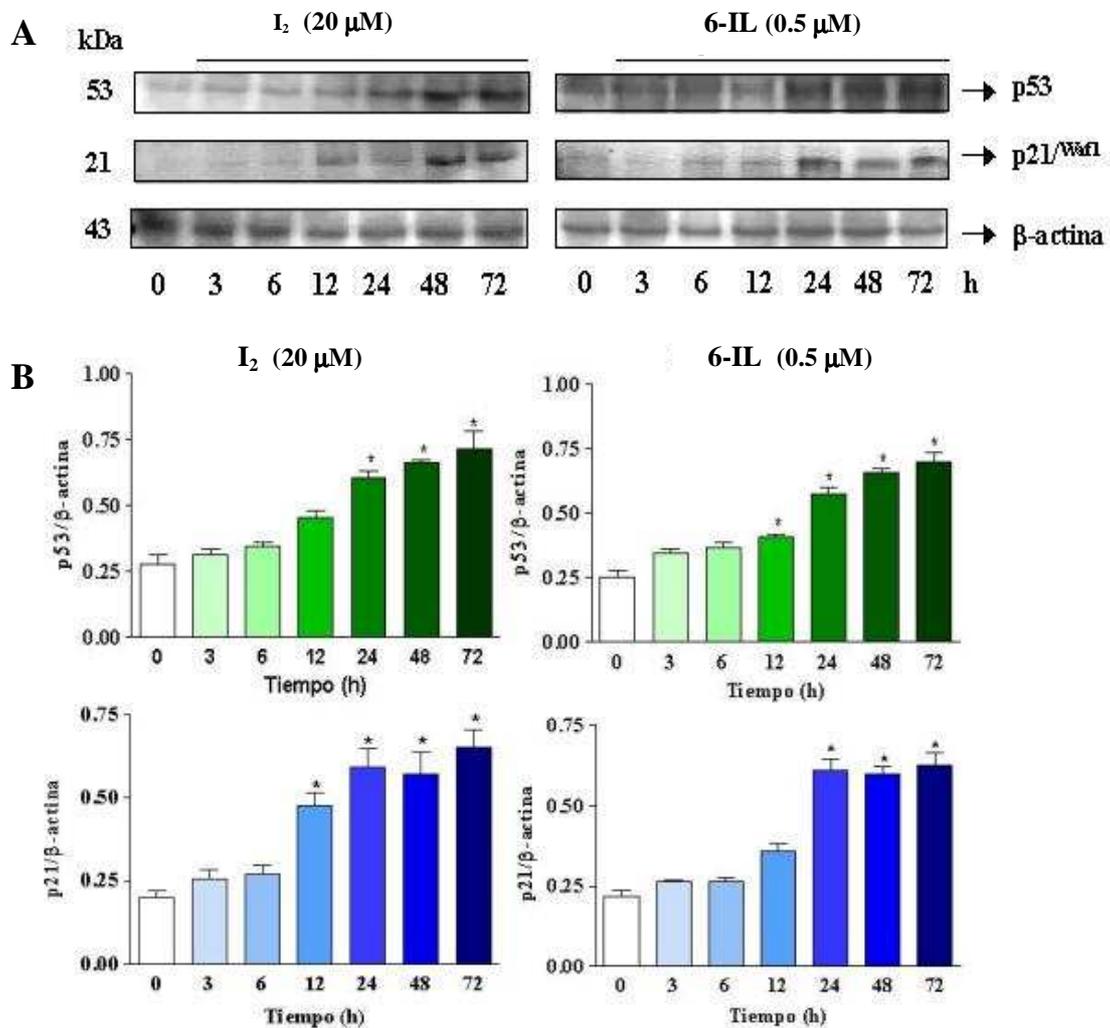


Figura 26. Efecto del I₂ y 6-IL en la expresión de p53 y p21^{Waf-1} en células MCF-7. **A**, inmunoblot representativo. **B**, Análisis densitométrico normalizado con los niveles de β-actina. Control se trataron con EtOH. Se ilustra media ± DE. p < 0.05. n=3.

4.6 EFECTO DEL I₂ Y 6-IL EN APOPTOSIS

4.6.1 I₂ y 6-IL inducen muerte celular sólo en las células tumorales

En los histogramas 24 y 25 se muestra claramente un incremento en el porcentaje de las células hipodiploides (Sub-G1), indicativo de muerte celular. En la figura 27 A, se cuantificaron por citometría de flujo las células que están en Sub-G1, los resultados demuestran que dosis bajas de I₂ (10-20 µM) no inducen muerte celular en células normales de epitelio mamario (MCF-12F), ya que sólo se detectaron entre 2 y 8 % de células en Sub-G1. A diferencia, dosis altas de I₂ (40 µM) son citotóxicas al inducir muerte celular al 25 % de la población celular (Figura 27 A). Los tratamientos con 6-IL inducen un efecto citotóxico dosis-respuesta al aumentar el porcentaje de células en Sub-G1 de un 8 % con 0.1 µM, hasta un 70 % con 1.0 µM de 6-IL.

En contraste, el tratamiento con dosis bajas de I₂ incrementa el porcentaje de las células en Sub-G1 de un 4 % en el control, a un 15 % con 10 µM, un 25 % con 20 µM y un 50 % con 40 µM en las células tumorales MCF-7 (Figura 27 B). Mientras que con 6-IL el porcentaje de células en Sub-G1 se incrementó a un 35 % con 0.1 µM, un 45 % con 0.5 µM y un 70 % con 1.0 µM, efecto dosis-respuesta (Figura 27 B). A diferencia de las células MCF-7, las células MDA-MB 231 requirieron de dosis mayores de I₂ (20-40 µM) y 6-IL (0.5-1.0 µM), para tener un efecto significativo en el porcentaje de células en Sub-G1. Aunque con 10 µM de I₂ y 0.5 µM tiende a aumentar el porcentaje de células en Sub-G1 (Figura 27 C).

Estos resultados indican que dosis bajas de I₂ inducen arresto celular en células normales MCF-12F, aunque dosis mayores a 40 µM inducen citotoxicidad. En las células tumorales MCF-7 los efectos deletéreos del I₂ se inducen desde dosis bajas de I₂ y dosis medias de I₂ (20 µM) y 6-IL (0.5 µM) para ejercer citotóxicidad en las MDA-MB 231.

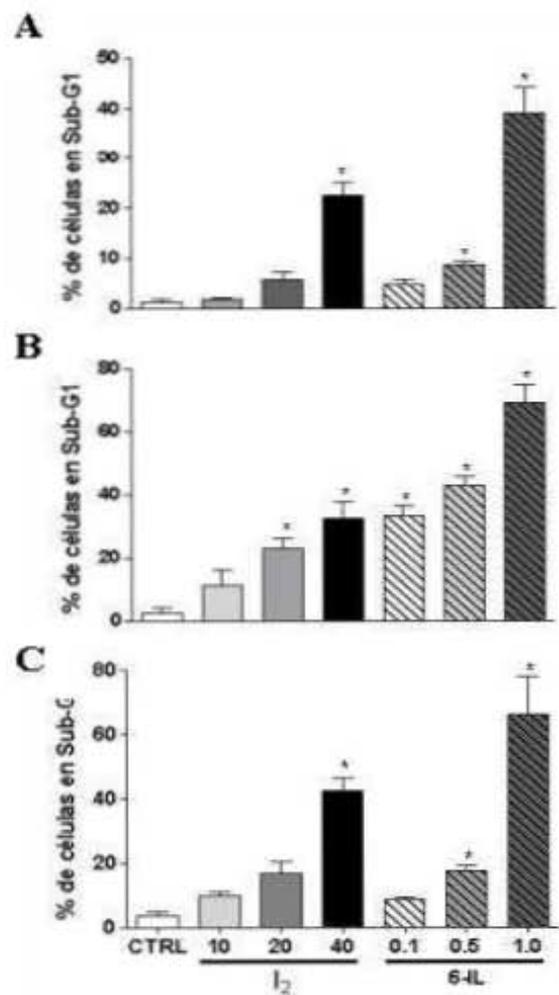


Figura 27. Efecto del I₂ y 6-IL en muerte celular por citometría de flujo. El porcentaje de las células hipodiploides (Sub-G1) se calculó usando el programa FloMax. Las células se trataron con diferentes dosis de I₂ y 6-IL durante 24 h, posteriormente se fijaron en EtOH, se tiñeron con DAPI y el contenido de DNA se analizó por citometría de flujo. Células; **A**, MCF-12F; **B**, MCF-7; **C**, MDA-MB 231. Se presenta la media ± DE. *P<0.05, **P<0.001 vs control. n=3.

4.6.2 Efecto del I₂ y 6-IL en la apoptosis

Para analizar si la muerte celular detectada por citometría de flujo involucra apoptosis, usamos el ensayo colorimétrico APOPercentageTM Biocolor, el cual tiñe de rojo a las células que translocan fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular, esta exposición es un evento temprano de apoptosis.

La figura 28 A es representativa de células MCF-7 tratadas con I₂ y 6-IL durante 24 h, las células teñidas con APOPercentage (células rojas o rosadas) están en apoptosis. Para cuantificar este evento se analizó la absorbancia del colorante y los resultados efectivamente muestran que el

tratamiento con I₂ en células MCF-12F, induce un efecto apoptótico sólo con dosis mayores de 40 µM. A diferencia del tratamiento con 6-IL que induce un efecto apoptótico dosis respuesta desde 0.1- 1.0 µM (Figura 28 B). En contraste, el tratamiento con I₂ y 6-IL a las 24 h induce apoptosis a dosis bajas y medias en las células tumorales MCF-7 y MDA-MB 231 (Figura 28 C y D).

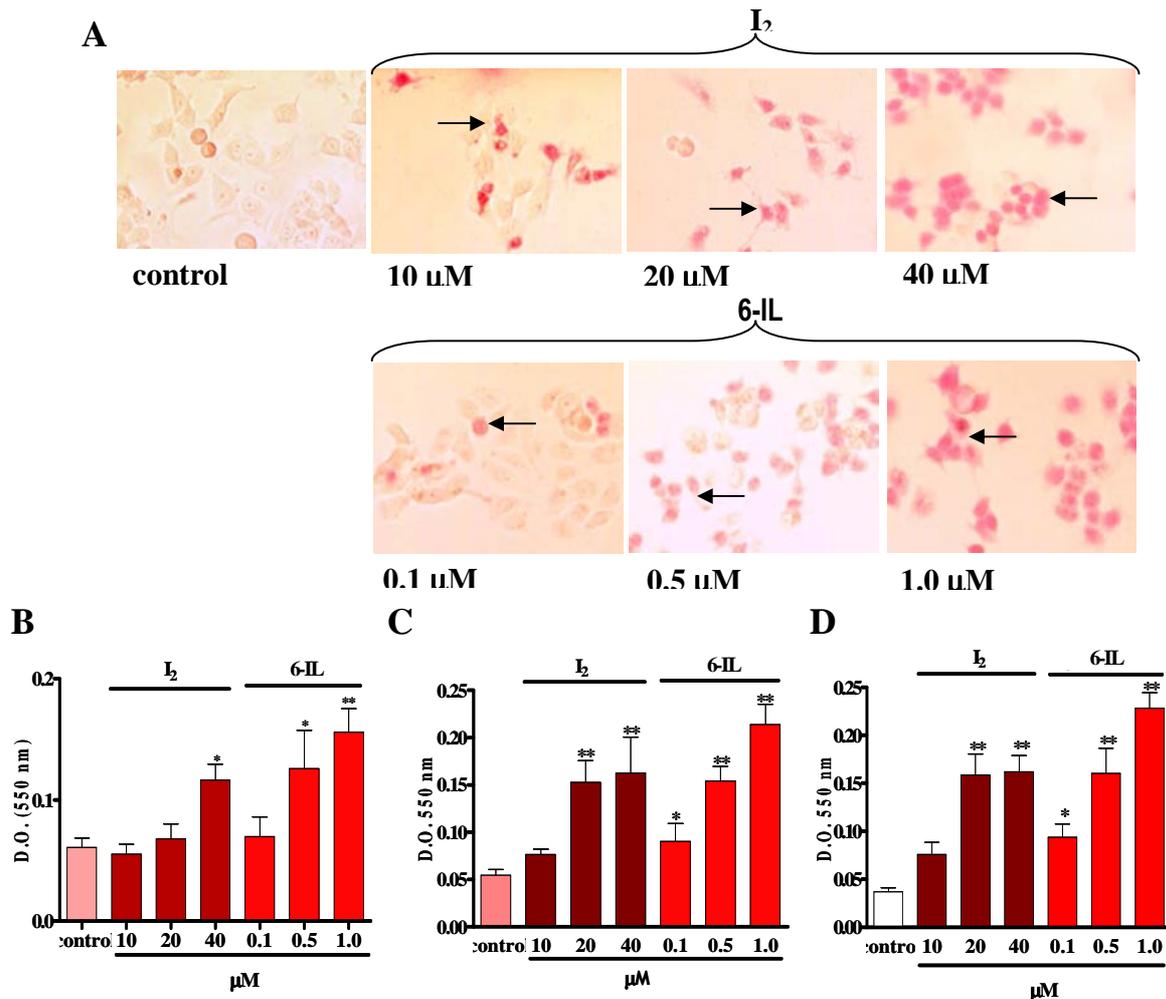


Figura 28. Efecto apoptótico del I₂ y 6-IL. A, fotografías representativas de cinco experimentos con resultados similares. Las flechas muestran células teñidas de rojo, indicativo de apoptosis. Imágenes a 10x. A, fotos representativas de células MCF-7 tratadas con I₂ y 6-IL teñidas con APOPercentage; análisis de la absorbancia del colorante APOPercentage; B, MCF-12F; C, MCF-7; D, MDA-MB 231. La absorbancia del colorante APOPercentage se determinó a 550 nm. Se ilustra media ± DE. n=5. * indica P < 0.05; ** indica P < 0.001 vs control.

7.1.4 El I₂ y 6-IL inducen fragmentación internucleosomal

Para corroborar el efecto apoptótico del I₂ y 6-IL, se extrajo el DNA de bajo peso molecular (200 a 5000 kb) y su fragmentación internucleosomal se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Como se observa en los carriles con dosis altas de I₂ (40 µM) o 6-IL (1.0 µM) provocan un patrón de escalera de DNA característico de fragmentación nuclear apoptótica sólo en las células MCF-12F. Mientras que dosis bajas y altas de I₂ (10-40 µM) o 6-IL (0.5-1.0 µM) inducen apoptosis en las células MCF-7 y MDA-MB 231 (Figura 29). Resultados similares se obtuvieron al teñir los núcleos con DAPI, ya que se observaron al microscopio de fluorescencia núcleos típicos de apoptosis, que exhiben cromatina condensada y cuerpos apoptóticos (datos no mostrados).

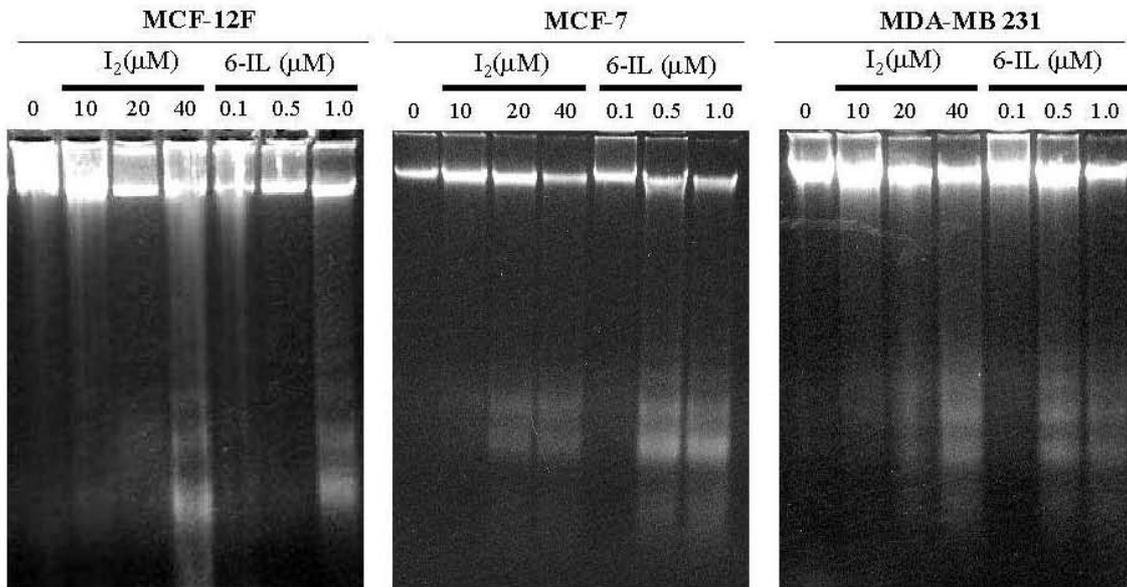


Figura 29. Análisis del DNA de bajo peso molecular por electroforesis en gel de agarosa en células tratadas con I₂ y 6-IL. Las células después de los tratamientos, se colectaron, se extrajo el DNA de bajo peso molecular y se analizó en un gel de agarosa al 2 %. Fotografías representativas de geles teñidos con bromuro de etidio. Fragmentación nuclear en células: **A**, MCF-12F; **B**, MCF-7; **C**, MDA-MB 231. Control (0), DNA de células tratadas con 1 % de EtOH. n=2.

4.7 Caracterización de las vías de señalización involucradas en el efecto apoptótico del I₂ y 6-IL en células MCF-7

4.7.1 Análisis de la expresión de Bcl-2 y Bax

Para analizar si la apoptosis inducida por I₂ y 6-IL es una consecuencia de la expresión alterada de miembros de la familia Bcl-2, analizamos la expresión de las proteínas Bax y Bcl-2 por inmunoblot en células MCF-7 tratadas con 20 μ M de I₂ y 0.5 μ M de 6-IL a las 24 horas de tratamiento. Los resultados indican un incremento significativo en la expresión de Bax y una disminución en Bcl-2, indicando un aumento en el índice apoptótico celular (Figura 30 A y B).

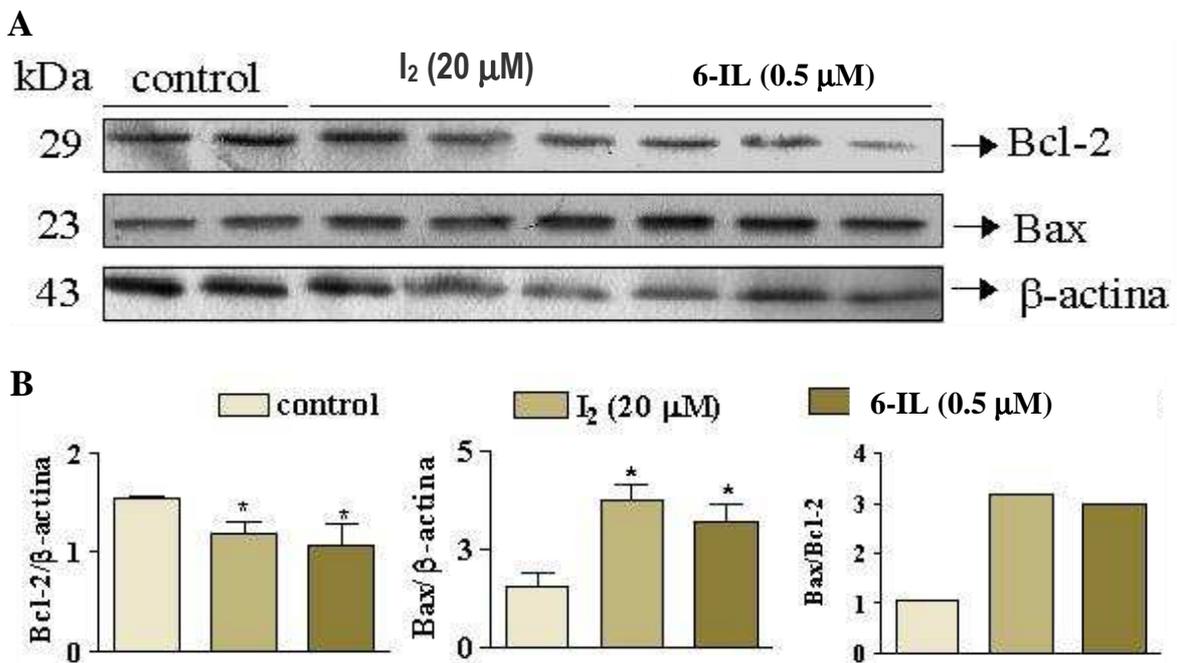


Figura 30. Efecto del I₂ y 6-IL en la expresión de Bax y Bcl-2 en células MCF-7. Las células se trataron con 20 μ M de I₂ y 0.5 μ M de 6-IL durante 24 h, posteriormente se colectaron las proteínas totales y se separaron en un gel SDS-PAGE al 12%. **A**, inmunoblot representativo para Bax y Bcl-2. **B**, Análisis densitométrico normalizado con los niveles de β -actina y el índice apoptótico Bax/Bcl-2. Control se trataron con 1 % EtOH. Se ilustra la media \pm DE. $p < 0.05$. $n = 3$.

4.7.2 Participación de PARP-1 y AIF en el efecto apoptótico del I₂ y 6-IL

PARP-1 es una enzima nuclear que responde ante daño al DNA facilitando su reparación (Yu et al., 2002); ante daño excesivo depleta los niveles de ATP y causa necrosis celular. Se ha reportado que las caspasas 3 y 7 mantienen los niveles de ATP necesarios para el programa apoptótico al inactivar a PARP-1 (113 kDa), liberando el fragmento apoptótico de PARP-1 de 85 kDa, el cual, estimula la liberación mitocondrial de AIF e induce fragmentación nuclear (Yu et al., 2002). En nuestro estudio la expresión de PARP-1 y AIF en fracciones proteicas citosólicas y nucleares se realizó por inmunoblot. En las células control tratadas con 1 % de EtOH, no se observa ni en la fracción nuclear, ni citosólica, la aparición del fragmento apoptótico de PARP-1 (Figura 31 A). Los resultados muestran la aparición del fragmento apoptótico de PARP-1 de 85 kDa en la fracción nuclear, en paralelo con su translocación al citosol después de 12 horas de tratamiento con 20 μ M de I₂ en células MCF-7 (Figura 31 B). Con 0.5 μ M de 6-IL el fragmento apoptótico de PARP-1 se libera al citosol y se transloca después de 6 h tratamiento (Figura 31 C).

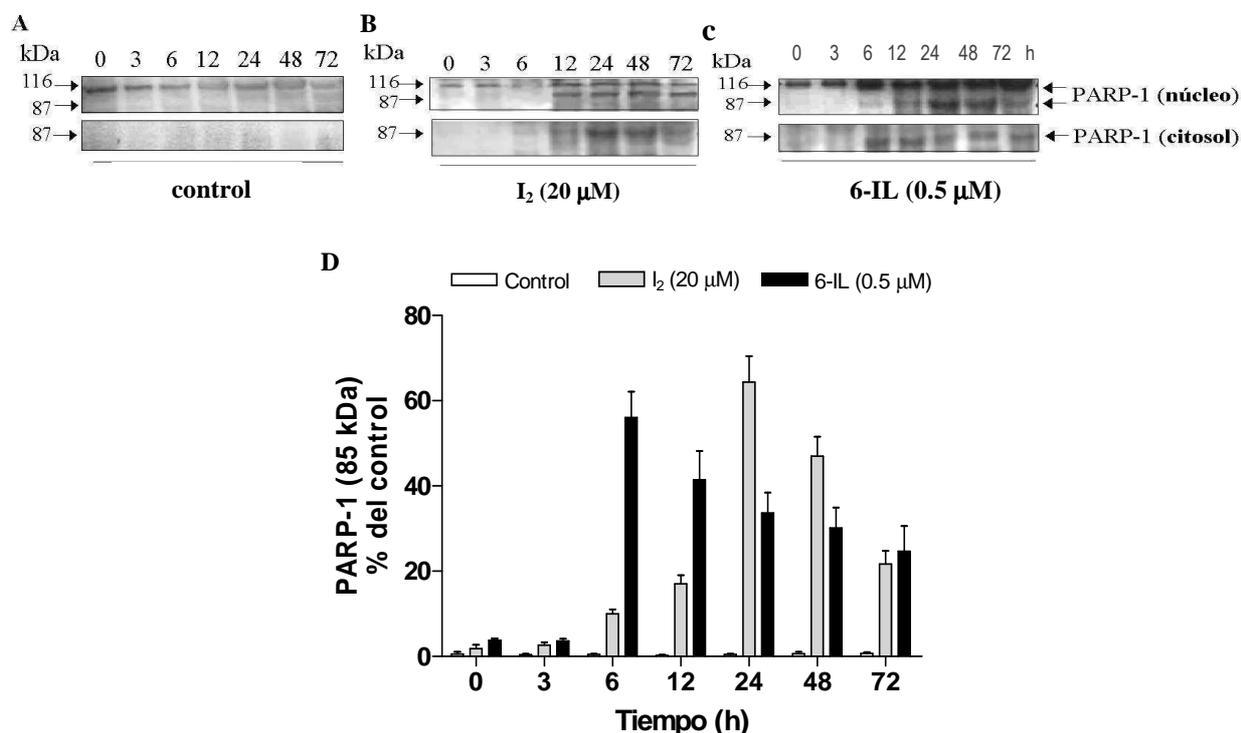


Figura 31. Inmunoblot de PARP-1. Las células MCF-7 se trataron con 20 μ M de I₂ y 0.5 μ M de 6-IL durante los tiempos indicados; posteriormente se colectaron las proteínas citosólicas ó nucleares y se separaron en un gel SDS-PAGE al 12%. El inmunoblot es representativo de tres experimentos con resultados similares. **A**, las células control se trataron con 1 % EtOH; **B**, tratadas con 20 μ M de I₂; **C**, tratadas con 0.5 μ M de 6-IL. **D**, Análisis densitométrico de PARP- 85 kDa, se expresa como % del control.

Estos resultados se correlacionan con la liberación al citosol de AIF y su translocación nuclear después de 24 h de tratamiento con 10 μM de I_2 (Figura 54 A). Mientras que con 0.5 μM de 6-IL se libera y transloca AIF a partir de 6 h después del tratamiento (Figura 32 B). Los resultados demuestran que PARP-1 y AIF están asociados en el proceso apoptótico mediado por I_2 y 6-IL.

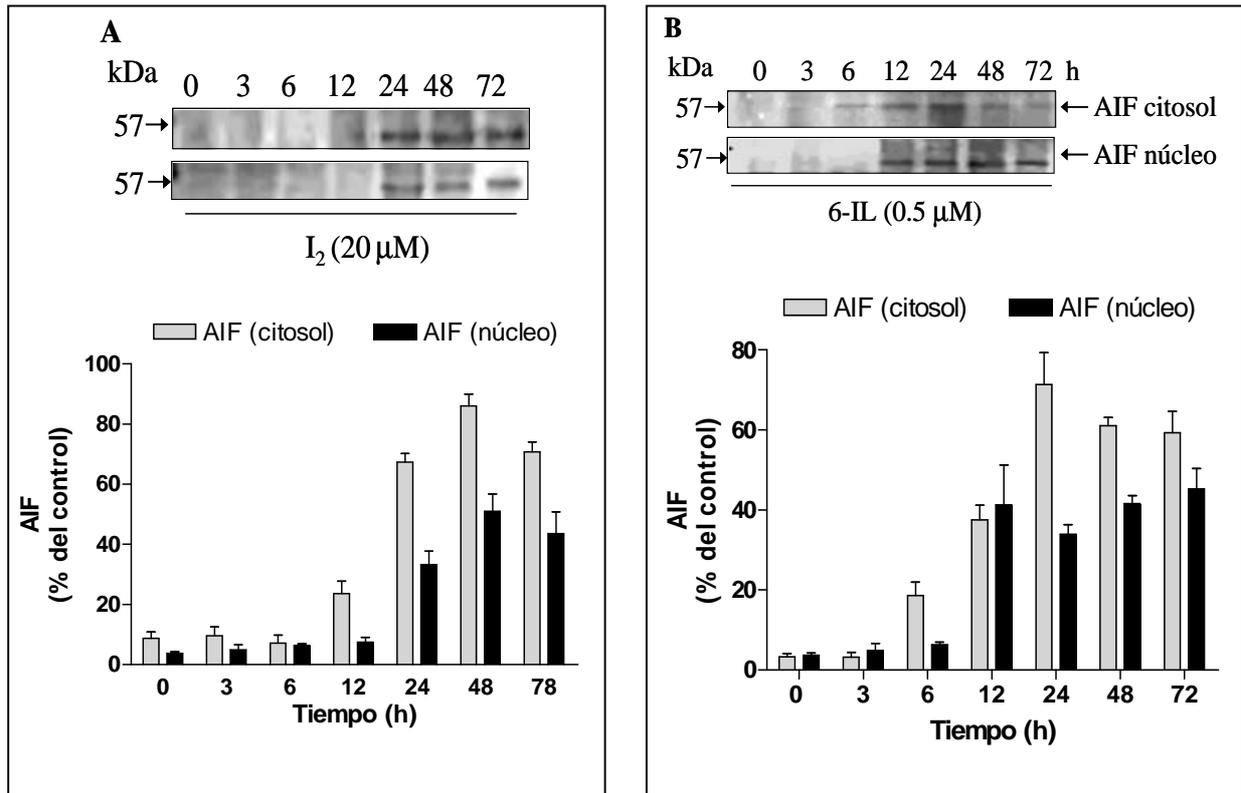


Figura 32. Immunoblot análisis de AIF. Las células MCF-7 se trataron con 20 μM de I_2 y 0.5 μM de 6-IL durante los tiempos indicados, posteriormente se colectaron las proteínas citosólicas o nuclear-PAGE al 12%. Immunoblot representativo y análisis densitométrico expresado como % del control de tres experimentos con resultados similares. Células tratadas con; **A**, 20 μM de I_2 ; **B**, 0.5 μM de 6-IL.

4.6.6 Activación de caspasa-7 sólo en células MCF-7 tratadas con I₂ y 6-IL

Las células MCF-7 son deficientes en caspasa-3, es por eso que analizamos la presencia del fragmento activo de la caspasa-7 por inmunoblot. Los resultados señalan que el efecto apoptótico del I₂ y 6-IL involucra la activación de caspasas, al detectar la expresión del fragmento activo de la procaspasa-7 a partir de las 12 h de tratamiento con 20 μ M de I₂ (Figura 33A), mientras que con 0.5 μ M de 6-IL se detectó a partir de las 6 h en proteínas totales de células MCF-7 (Figura 33B).

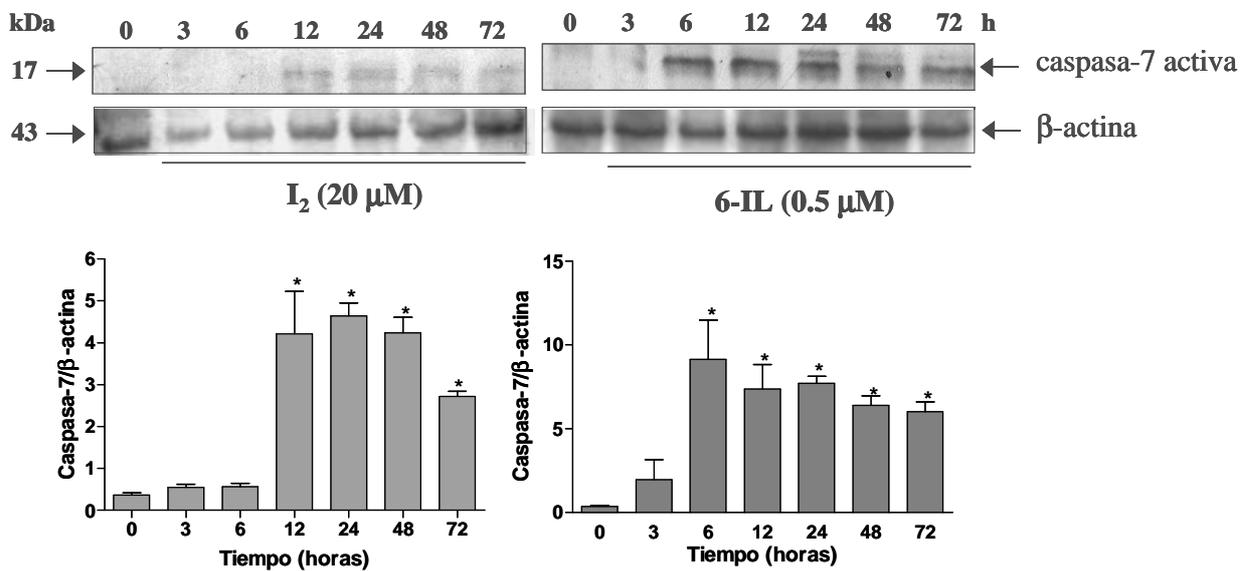


Figura 33. Inmunoblot del fragmento activo de la procaspasa-7. Las células MCF-7 se trataron con 20 μ M de I₂ y 0.5 μ M de 6-IL durante los tiempos indicados, posteriormente se colectaron las proteínas totales y se separaron en un gel SDS-PAGE al 12%. Inmunoblot representativo de dos experimentos con resultados similares. **A**, tratadas con 20 μ M de I₂; **B**, tratadas con 0.5 μ M de 6-IL. Se ilustra la media \pm DE. $p < 0.05$. $n = 3$.

DISCUSIÓN

El trabajo consistió en la caracterización de la captura, la formación de 6-IL y las vías de señalización usadas en los efectos antiproliferativos y apoptóticos del I₂ en células mamarias normales y tumorales.

Captura

Diversos estudios han demostrado que la captura de I⁻ en la glándula mamaria lactante y tumoral (MCF-7) depende de los transportadores NIS y PDS (Rillema y Hill, 2003a, b; Kogai et al., 2000). Resultados previos en nuestro laboratorio mostraron que la captura *in vivo* de I₂ en mama virgen, lactante y tumoral de rata no depende de NIS (García-Solís et al., 2005), lo que sugirió la utilización de un mecanismo de captura alternativo para esta forma química de yodo. En este estudio corroboramos que la captura de I⁻ en células MCF-7 depende de NIS, y demostramos por primera vez que las células MCF-7 captan 5 veces más I₂ que I⁻ y que NIS o PDS no participan en la captura de I₂. El mecanismo de captura del I₂ es saturable (>5 μM) con una K_m 0.91 μM y una V_{max} de 1.13 pmol/min/ 10⁴ células, el cual es 10 veces más sensible que NIS (K_m 21.9 μM). Los resultados también mostraron que la captura de I₂ es dependiente de la síntesis de proteínas e independiente de Na⁺ y ATP. Estas características son semejantes a las del transportador PDS (Rillema y Hill, 2003b), sin embargo la captura de I₂ no se inhibió con dosis similares de DIDS, el cual es un inhibidor de PDS. Todos estos datos indican que la captura del I₂ involucra un mecanismo de difusión facilitada diferente de NIS y PDS. En contraste, las características del transportador de I₂ son consistentes con datos reportados para la captura de I₂ en algas laminarias y fucales, donde primero se requiere de la oxidación de I⁻ a I₂ por exohaloperoxidasas y su transporte mediado por un proceso de difusión facilitada altamente sensible con una K_m de 2 μM para laminarias y 6 μM para fucales (Kupper et al., 1998). Este dato y el hallazgo de que todas las células analizadas en este estudio (mamarias diferenciadas o indiferenciadas, así como fibroblastos) captan I₂, sugieren que el mecanismo de captura de esta forma química de yodo es un sistema común y evolutivamente conservado. Será necesario llevar a cabo más estudios para analizar esta hipótesis.

Formación de yodolactona

Se ha reportado que en la GT el efecto apoptótico del yodo está mediado por la formación de derivados yodados como la 6-IL y la yodoheptadecanal (Dugrillon et al., 1994; Langer et al., 2003). Igualmente se ha reportado que los tumores de la glándula mamaria inducidos con DMBA contienen altas concentraciones de AA (el precursor de 6-IL), en comparación con la glándula mamaria normal (Rillema y Mulder, 1978). En este estudio se demostró que también los tumores inducidos con MNU presentan altas concentraciones de AA, y sólo en tumores de ratas suplementadas crónicamente con I_2 se detectó la 6-IL. En contraste, las bajas concentraciones de AA detectadas en la glándula mamaria normal, podrían explicar por qué aún en presencia de I_2 no se detecta la 6-IL en estas células. Más aún, la detección de lípidos yodados que coemigran con el estándar de la 6-IL en células MCF-7 tratadas con I_2 , sugiere la presencia de elevadas cantidades de AA en estas las células tumorales. Todos estos datos permiten proponer que las altas concentraciones de AA y por ende la formación de 6-IL, condicionan que, concentraciones moderadas de I_2 ejerzan efectos antiproliferativos y apoptóticos sólo en las células tumorales.

Mecanismos de acción

Los efectos antiproliferativos y apoptóticos del I^- y 6-IL se han demostrado en la GT y en la glándula mamaria (Langer et al., 2003; García-Solís et al., 2005), no obstante, se desconoce el mecanismo involucrado. En este estudio demostramos que dosis bajas de I_2 (10-20 μ M) inhiben la proliferación celular y causan arresto celular en G1 ó G2/M en las tres líneas celulares, y que sólo en las células tumorales, estas mismas dosis inducen apoptosis. En las células normales se requieren dosis mayores a 40 μ M de I_2 para inducir efectos apoptóticos. En contraste en todas las células normales o tumorales, se requieren de 20 a 40 veces menos 6-IL para ejercer los mismos efectos. Estos datos concuerdan con lo reportado en tirocitos en cultivo, que demuestran que la suplementación de altas concentraciones de I^- inducen arresto celular en G1 ó G2/M siempre y cuando el I^- sea oxidado por la enzima TPO (Tramontano et al., 1989; Smerdely et al., 1993). En estos mismos cultivos la administración de 40 veces menos de 6-IL provoca apoptosis (Langer et al., 2003). Estos datos indican que el efecto antiproliferativo y apoptótico del I_2 parece estar mediado por la formación intracelular de la 6-IL.

Nuestro grupo de trabajo ha propuesto que la 6-IL puede actuar a través de su unión a los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) (Levine, 1997; Han et al., 2004; Niida y Nakanishi, 2006). Estos receptores pertenecen a la familia de los receptores nucleares y en presencia de sus ligandos (como por ejemplo el AA), participan en procesos de proliferación, ciclo celular y apoptosis (Rosen y Spiegelman 2001, Shen y Brown 2003). Estudios en el laboratorio han demostrado que los PPAR unen a la 6-IL de manera específica y con una afinidad 6 veces mayor al AA (Datos no publicados, Nuñez-Anita et al, 2007).

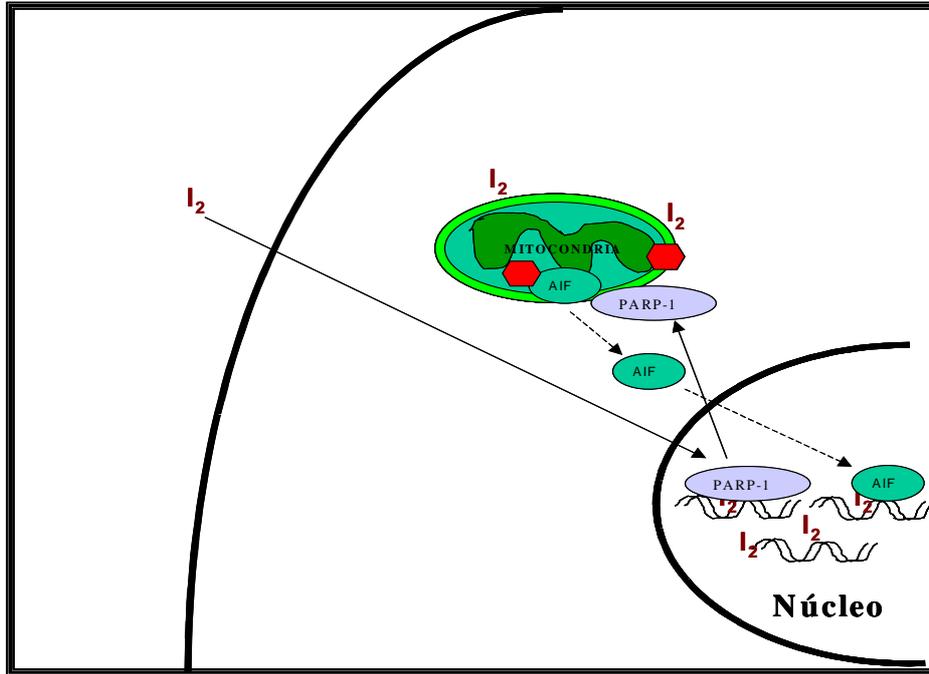
Vías de señalización

Dado que los PPAR son receptores relacionados a vías de apoptosis dependientes de caspasas, otro de los objetivos del proyecto fue analizar si el efecto antiproliferativo y apoptótico del I₂ y de la 6-IL era similar, y qué vías de señalización podrían estar involucradas. Los resultados mostraron en general que el I₂ y la 6-IL operan de la misma forma y que parecen activar vías dependientes e independientes de caspasas. Efectivamente, ambos compuestos incrementaron la expresión de p53, p21, Bax y caspasa-7 en células MCF-7. Se conoce que p53 bajo ciertas circunstancias de daño celular, puede activar la expresión de la proteína proapoptótica Bax. Homodímeros de Bax forman poros en la membrana mitocondrial y causan la liberación de moléculas apoptóticas de alto peso molecular como citocromo c. Esta proteína induce la formación del apoptosoma, donde la iniciadora procaspasa-9, activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, causando fragmentación oligonucleosomal del DNA (múltiplos de 180 pb) (Hu et al., 1998; Johnson y Howerth, 2004). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Shrivastava et al., (2006), quienes con 4 µM de lugol (combinación de I₂ y I⁻) inducen apoptosis en las células tumorales de glándula mamaria MCF-7, T-47D y MDA-MB 453, asociada a incrementos en la expresión de las proteínas p53 y Bax en células MCF-7 (Shrivastava et al., 2006).

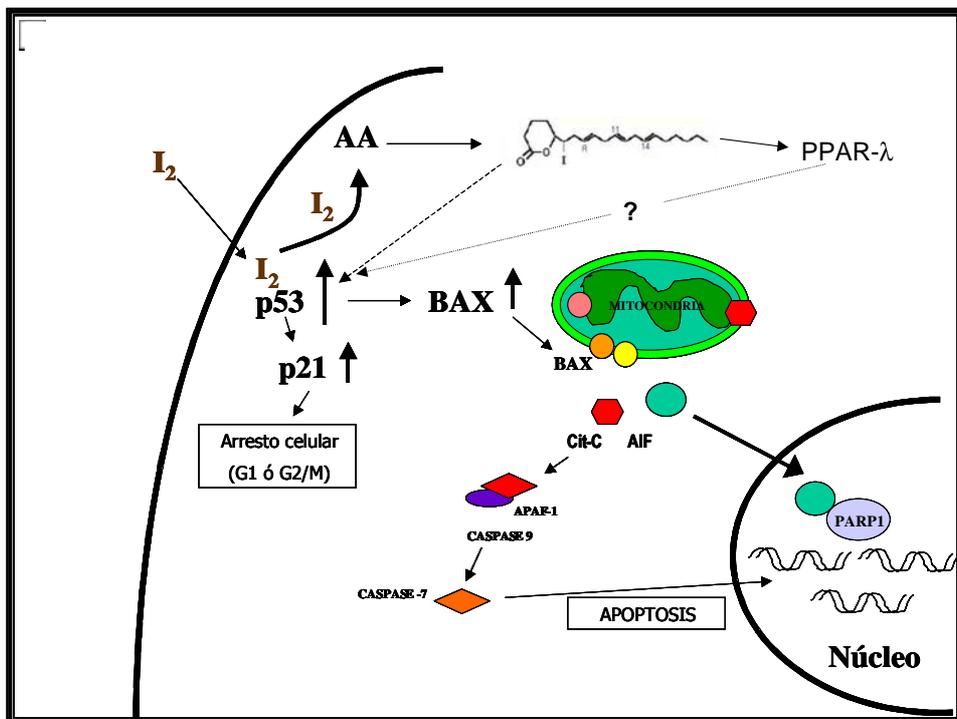
En nuestro estudio, también detectamos los fragmentos apoptóticos de AIF y PARP-1 en la apoptosis inducida por I₂ y 6-IL. Diversos estudios han señalado que el daño al DNA por especies reactivas de oxígeno (ROS) libera del núcleo el fragmento apoptótico de 85 kDa de PARP-1 e induce la liberación mitocondrial de AIF (Cregan et al., 2004). Una vez liberado AIF puede ejecutar apoptosis independiente de caspasas, al translocarse al núcleo e inducir

fragmentación nuclear (Li et al., 2001; Cregan et al., 2004). Nuestros datos mostraron que el fragmento apoptótico de PARP-1 sale del núcleo a la fracción citosólica, en paralelo con la activación y liberación mitocondrial de AIF en células MCF-7 tratadas con I_2 ó 6-IL. La apoptosis dependiente de AIF y PARP-1 inducida con 6-IL, correlaciona con lo reportado en otros estudios para la apoptosis inducida con bromoenol-lactona, sesquiterpeno-lactona y ácido eicosapentanoico, donde demuestran la activación de PARP-1 y liberación de AIF al incrementar ROS (Fuentes L et al., 2003; Nakagawa et al., 2005; Koumura et al., 2005). La activación de esta vía independiente de caspasas puede explicarse por el efecto del I_2 per se como un radical libre. Efectivamente, se ha demostrado que el I_2 actúa como un radical libre incorporándose a diversos componentes celulares como lípidos, proteínas y DNA (Venturi y Venturi, 2000, Cocchi y Venturi., 2000). Datos en la literatura demuestran que el tratamiento con I_2 afecta el estado redox celular, al disminuir el contenido total de tioles (Shrivastava et al., 2006) y causar la yodación de residuos de tirosina, cisteína ó histidina (Venturi y Venturi, 2000, Cocchi y Venturi., 2000). Estos datos podrían explicar el arresto celular mediado por I_2 en las células normales y tumorales ya que se ha demostrado que el estado redox y el contenido de tioles es muy importante para la función óptima de las proteínas como las CDKs y RB que requieren ser fosforiladas en residuos de tirosina, cisteína y treonina para la progresión del ciclo celular (Yamauchi y Bloom 1997). El hallazgo de que en las células normales, las cuales no contienen 6-IL, se requieran concentraciones elevadas de I_2 (más de 40 μ M) para provocar apoptosis, nos permiten sugerir que en estas células, el exceso de I_2 como un radical libre, induce la apoptosis por la vía de PARP-1.

Mecanismo de acción del yodo (altas concentraciones) en células normales



Esquema del mecanismo de acción del yodo en células tumorales



VI. CONCLUSIONES:

Los datos de este trabajo mostraron que:

- La captura de I_2 no depende de los transportadores de Γ NIS o PDS.
- La captura de I_2 ocurre por difusión facilitada con una K_m de $0.91 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $1.13 \text{ pmol/min}/10^4$.
- El I_2 intracelular es incorporado en las células tumorales a lípidos que coemigran de manera similar a la 6-IL.
- Bajas concentraciones de I_2 generan arresto celular tanto en las células mamarias normales como en las tumorales.
- Concentraciones moderadas de I_2 , inducen apoptosis en las células mamarias tumorales y su efecto está mediado por dos vías; dependiente de caspasas y PARP-1/AIF.
- Concentraciones elevadas de I_2 inducen apoptosis en las células mamarias normales y en las tumorales y su efecto está mediado por la vía PARP-1/AIF.

Este estudio sugiere que el efecto antitumoral del I_2 está mediado por la formación de 6-IL y por la activación de las vías p53-Bax-caspasa y PARP-1-AIF. Se propone incorporar el estudio de la suplementación de I_2 en terapias tanto de profilaxis como de tratamiento del cáncer mamario.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aceves C, Anguiano B y Delgado G. 2005. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland?. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*. 2, 189-196.
- Adami OH, Signorello LB y Trichopoulos D. 1998. Towards an understanding of breast cancer etiology. *Semin Cancer Biol*. 8, 255-262.
- Adams JM y Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cellular survival. *Science*. 281, 1322-1326.
- Arroyo-Helguera O, Mejía-Viggiano C, Varela-Echavarría A, Cajero-Juárez M y Aceves C. 2005. Regulatory role of the 3' untranslated region (3'UTR) of rat 5' deiodinase (D1). Effects on messenger RNA translation and stability. *Endocrine*. 27, 219-225.
- Bagchi N y Fawcett DM. 1973. Role of sodium ion in active transport of iodide by cultured thyroid cells. *Biochim Biophys Acta*. 318, 235-251.
- Bligh EG y Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37, 911-917.
- Boeynaems JM y Hubbard WC. 1980. Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by rat thyroid. *Journal of Biological Chemical*. 225, 9001-9004.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Beown JP, Sedivy JM, Kinszler KW y Vogelstein B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 282, 1497-1501.
- Cann SA, van Netten JP y van Netten C. Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control*. 2000. 11, 121-127.
- Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta*. 1993. 1154, 65-82.
- Carrasco N. Thyroid Iodide transport: the Na⁺/I⁻ symporter (NIS). En: Braverman LE, Utiger R, editors. *Werner & Ingbar's The Thyroid: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000. p. 52-61.
- Chao DT y Korsmeyer SJ. 1998. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Revv Immunol*. 16, 395-419.
- Cocchi M y Venturi. 2000. Iodide, antioxidant function and omega-6 and omega-3 fatty acids: A new hypothesis of biochemical cooperation?. *Prog Nutr*. 2, 15-19.

- Cordon-Cardo C. 1995. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol.* 147, 545–560.
- Cregan SP, Dawson VL y Slack RS. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* 23, 2785-2796.
- Dai G, Levy O. y Carrasco N. 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 379, 458-460.
- De la Vieja A, Dohan O, Levy O, y Carrasco N. 2000. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid y extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev.* 80, 1083-1105.
- Denecker G, Doms h, Van Loo G, Vercaemmen D, Grooten J, Fiers W, Declercq W y Vandenaebelle P. 2000. Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome *c* and decrease in mitochondrial transmembrane potential. *FEBS Letters.* 465, 47-52.
- Dugrillon A, Bechtner G, Uedelhoven WM, Weber PC y Gartner T. 1990. Evidence that an iodolactone mediates the inhibitory effect of iodide on thyroid cell proliferation but not on adenosine 3'-5'-monophosphate formation. *Endocrinology.* 127, 337-343.
- Eskin BA, Grotkowski CE, Connolly CP, Ghent WR. 1995. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biol Trace Elem Res.* 49, 9-19.
- Feigelson HS y Henderson BE. 1996. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis.* 17, 2279-2284.
- Fuentes L, Pérez R, Nieto ML, Balsinde J y Balboa MA. 2003. Bromoenol lactona promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem.* 278, 44683-44690.
- Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tsukamura K, Hayakawa Y, Kikumori T, Mase T, Itoh T, Nishikawa M, Hayashi H, Shibata A, Hibi Y, Takahashi M y Narita T. 1999. Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors in rats. *Jpn J Cancer Res.* 90, 922-927.
- Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, Nshikawa M, Suda N, Hibi Y, Mizuno Y, Tsukamura K, Hayakawa A y Tanuma S. 2001. Seaweed prevents breast cancer? *Jpn J Cancer Res.* 92, 483-487.
- Ganong WF. 1990. *Fisiología Médica. El manual moderno.* México, pp.41.

- García-Solís P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guzmán RC, Nandi S, Díaz-muñoz M, Vázquez-Martínez O y Aceves C. 2005. Inhibition of induced-MNU mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide (I⁻) treatment. Evidence that I₂ prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocr.* 236, 49-57.
- García-Solís P y Aceves C. 2003. 5'Deiodinase in two breast cancer cell lines: effect of triiodothyronine, isoproterenol and retinoids. *Mol Cell Endocrinol.* 201, 25-31.
- Ghent WR, Eskin BA, Low DA y Hill LP. 1993. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Can J Surg.* 36, 453-460.
- Gottlieb TM y Oren M. 1996. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta.* 1287, 77-102.
- Green DR y Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281, 1309-1312.
- Han S, Sidell N, Fisher PB y Roman J. 2004. Up-regulation of p21 Gene Expression by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Human Lung Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research.* 10, 1911-1919.
- Hanahan D y Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100, 57-70.
- Harvey et al 1999.
- Hengartner MO y Horvitz HR. 1994. C. Elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene Bcl-2. *Cell.* 76, 665-676.
- Hermann S. 1995. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science.* 267, 142-1445.
- Higginson J. 1993. Environmental carcinogenesis. *Cancer.* 72, 971-977.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N y Nuñez G. 1998. Bcl-X_L interacts with Apaf-1 and inhibits APAf-1-dependent caspase 9 activation. *Proc Natl AcadSci USA.* 95, 4386-4391.
- Issemann I y Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 347, 645-650.
- Jacobsen MD, Weil M y Raff MMC. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88, 347-354.
- Johnson ME y Howerth EW. 2004. Survivin: A Bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol.* 41, 599-607.
- Kelsey JL y Gammon MD. 1991. The epidemiology of breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 41, 146-165.

- Kendel j. 1994. Analytical Chemistry for Technicians, second ed. CRC press LLC, Boca Raton, FL, pp 164-166.
- Kerr JR, Wyllie AH y Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26, 239-257.
- Kessler JH. 2004. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *The Breast Journal*. 10, 328-336.
- Kodama M, Kodama T, Miura S y Yoshida M. 1991. Nutrition and breast cancer risk in Japan. *Anticancer Res*. 11, 745-754.
- Kodama M y Kodama T. 1991. Interrelation between western type cancers and non-western type cancers as regards their risk variations in time and space. III. A contrast between bladder cancer and stomach cancer. *Anticancer Res*. 11, 1895-1904.
- Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, Huang M y Brent GA. 2000. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97, 8519-8524.
- Koumura T, Nakamura C y Nakagawa Y. 2005. Involvement of hydroperoxide in mitochondria in the induction of apoptosis by the eicosapentaenoic acid. *Free Radical Research*. 39, 225-235.
- Kupper C. 2001. Preventing iodine deficiency in pregnancy and breast feeding. Passivity means health risks for mother and child. *Kinderkrankenschwester*. 20, 303-306.
- Lacroix L, Pourcher T, Magnon C, Bellon N, Talbot M, Intaraphairot T, Caillou B, Schlumberger M y Bidart JM. 2004. Expression of the Apical Iodide Transporter in Human Thyroid Tissues: A Comparison Study with Other Iodide Transporters. *J Clin Endocrinol Metab*. 89, 1423-1428.
- Lane DP. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358, 15-16.
- Langer R, Burzler C, Bechtner G y Gartner R. 2003. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 111, 325-329.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and división. *Cell*. 88, 323-328.
- Lewis RN y Bowler K. 1983. Rat brain (Na⁺-K⁺)ATPase: modulation of its ouabain-sensitive K⁺-PNPPase activity by thimerosal. *Int J Biochem*. 15, 5-7.

- Li P, Nijhawan D, Budihardjo L, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES y Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91, 479-489.
- Lowe SW, Schmitt E y Smith SW. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 36, 847-849.
- Marine D y Feiss HO. 1995. The absorption of potassium iodide by perfused thyroid glands and some of the factors modifying it. *J Pharmacol Exp Ther*. 7, 557-576.
- Mcalpine RK. 1945. The rate of the oxidation of iodide ion by hydrogen peroxide. *J. Chem. Educ*. 22, 387-390.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH y Peter ME. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*. 16, 2794-2804.
- Medina D. 2004. Breast cancer: the protective effect of pregnancy. *Clin Cancer Res*. 10, 380S-384S.
- Monteagudo ES, Caro HN, Veleiro AS, Pisarev MA y Burton G. 1990. Synthesis and characterization of iodinated derivatives of arachidonic acid. *Anales de la Asociación de Química de Argentina*. 78, 31-36.
- Moser M, Winkler R, Huber E y Maier K. 1994. Changes in selenium status, antioxidant enzyme activity and lipid peroxide level after drinking cures in Bad Hall health resort]. *Wien Klin Wochenschr*. 106, 54-59.
- Naik P, Karrim J y Hanahan D. 1996. The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. *Genes Dev*. 10, 2105-2116.
- Niida H y Nakanishi M. 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*. 21, 3-9.
- Nakagawa Y, Limuna M, Matsuura N, Yi K, Naoi M, Nakayama T, Nozawa Y y Akao Y. 2005. A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J pharmacol Sci*. 97, 242-252.
- Núñez-Anita R. E, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L and Aceves C. 2007. 6-iodo-delta-lactone identified as novel ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *Enviado JBC*.

- Oda E, Ohki R y Murasawa H. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 288, 1053-8.
- Oltvai ZN, Milliman CL y Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74, 609-619.
- Orlow I, Lacombe L y Hannon GJ. 1995. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst*. 87, 1524-1529.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J y Pisani P. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 94, 153-156.
- Rillema JA y Hill MA. 2003. Pendrin transporter carries out iodide uptake into MCF-7 human mammary cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 228, 1078-1082.
- Rillema JA y Hill MA. 2003. Prolactin regulation of the pendrin-iodide transporter in the mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284, E25-E28.
- Rillema JA y Mulder JA. 1978. Arachidonic acid distribution in lipids of mammary glands and DMBA-induced tumors of rats. *Prostaglandins Med*. 1, 31-8.
- Rosen ED y Spiegelman BM. 2001. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 37731-37734.
- Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD y Green ED. 2000. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 141, 839-845.
- Russo J, Romero AL y Russo IH. 1998. Architectural pattern of the normal and cancerous breast under the influence of parity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 3, 219-224.
- Russo J y Russo IH. 1994. Toward a physiological approach to breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 3, 353-64.
- Russo J y Russo IH. 1997. Differentiation and breast cancer. *Medicina (B Aires)*. 2, 81-91.
- Schafer KA. 1998. The cell cycle: A review. *Vet Pathol*. 35, 461-478.
- Salmon JA y Flower RJ. 1982. Extraction and Thin-Layer Chromatography of Arachidonic Acid Metabolites. *Methods in Enzimology*. 86, 477-493.
- Seidman H, Selikoff IJ y Hammond EC. 1982. Mortality of brain tumors among asbestos insulation workers in the United States and Canada. *Ann N Y Acad Sci*. 381, 160-171.

- Shen Q y Brown PH. 2003. Novel agents for the prevention of breast cancer: targeting transcription factors and signal transduction pathways. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 8, 45-73.
- Shennan DB y Boyd CA. 1986. External anions relieve DIDS inhibition of SO₄ efflux from placental membrane vesicles. *Biosci Rep*. 6, 889-894.
- Shrivastava A, Tiwari M, Sinha RA, Kumar A, Balapure AK, Bajpai VK, Sharma R, Mitra K, Tandon A y Godbole MM. 2006. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving mitochondria-mediated pathway. *J of Biol Chem*. 281, 19762-19771.
- Smyth PP. 2003. Role of iodine in antioxidant defence in thyroid and breast disease. *Biofactors*. 19, 121-130.
- Smerdely P, Pitsiavas V y Boyages SC. 1993. Evidence that the inhibitory effects of iodide on thyroid cell proliferation are due to arrest of the cell cycle at G₀G₁ and G₂M phases. *Endocrinology*. 133, 2881-2888.
- Smyth PP. 2003. The thyroid, iodine and breast cancer. *Breast Cancer Res*. 5, 235-238.
- Thornberry NA y Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281, 1312-1316.
- Thrall KD, Sauer RL y Bull RJ. 1992b. Evidence of thyroxine formation following iodine administration in Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Health*. 37, 535-548.
- Tong Q, Ryu RY y Jhiang SM. 1997. Promotor characterization of the rat Na⁺/ I⁻ symporter gene *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 239, 24-41.
- Tramontano D, Veneziani BM, Lombardi T, Villone G y Ingbar SH. 1989. Iodine inhibits the proliferation of rat thyroid cells in culture. *Endocrinology*. 126, 984-992.
- Tseng YL y Latham KR. 1984. Iodothyronines: oxidative deiodination by hemoglobin and inhibition of lipid peroxidation. *Lipids*. 19, 96-102.
- Vaticon D. 1992. Fisiología de la fecundación, embarazo, parto y lactancia. En: J A F Tresguerres (Ed) *Fisiología humana*. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. pp: 1077-1109.
- Vaux DL, Weissman IL, y Kim SK. 1992. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human Bcl-2. *Science*. 258, 1955-1957.
- Venturi S, Venturi M. 1999. Iodide, thyroid and stomach carcinogenesis: evolutionary story of a primitive antioxidant? *Eur J Endocrinol*. 140, 371-372.

- Vermeulen K, Van Bockstaele DR y Berneman ZN. 2005. Apoptosis: mechanism and relevance in cancer. *Ann Hematol.* 84, 627-639.
- Vitale M, Matola DD, D'Ascoli F, Salzano SS, Bogazzi FF, Fenzi G, Martino EE y Rossi GG. 2000. Iodine excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology.* 141, 598-605.
- Vousden KH. 2000. p53: The death star. *Cell.* 101, 691-694.
- Watson CJ. 2006. Post-lactational mammary gland regression: molecular basis and implications for breast cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 32, 1-13.
- Weiss SJ, Philp NJ y Grollman EF. 1984. Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology.* 114, 1090-1098.
- Winkler R, Griebenow S y Wonisch W. 2000. Effect of iodide on total antioxidant status of human serum. *Cell Biochem Funct.* 18, 143-146.
- Wynder EL, Fujita Y, Harris RE, Hirayama T y Hiyama T. 1991. Comparative epidemiology of cancer between the United States and Japan. A second look. *Cancer.* 67, 746-763.
- Wu X, Bayle JH y Olson D. 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126-1132.
- Xu HJ, Cairns P y Hu SX. 1993. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer.* 53, 781-784.
- Yang J, Xing T y Hu R. 1999. Expression of C-erbB-2 protein in breast cancer and its clinical significance. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 30, 75-76.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers W, Federoff HJ, Poirier GC, Dawson TM y Dawson VL. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 297, 259-263.
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, et al. 1993. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 85, 1819-1827.

VI. ANEXOS

ANEXO 1

8.1.1 Ciclo celular

La vida de una célula consta de dos etapas diferentes: 1) la interfase, que es una etapa en la cual tiene lugar el crecimiento de la célula y el desarrollo de las actividades metabólicas normales, y 2) la división celular, que es un proceso biológico que en los seres unicelulares permite su multiplicación y en los pluricelulares el crecimiento, el desarrollo, la regeneración de órganos, tejidos y las funciones de reproducción. El conjunto de ambas componen el ciclo celular (Schafer, 1998).

La interfase se puede subdividir en tres periodos: G1, S y G2. El periodo G1 sigue a la mitosis anterior y corresponde a la fase de desarrollo de la célula. Los cromosomas se encuentran esparcidos en el interior del núcleo celular asociados a las histonas formando las fibras nucleosómicas. Los genes se transcriben de acuerdo con las necesidades metabólicas que presenta la célula en cada momento. En el citoplasma se suceden los diferentes procesos metabólicos y los organelos celulares se forman también en este periodo. La síntesis de DNA ocurre en el periodo S, aquí la doble hélice se abre en diversos puntos llamados ojos de replicación, y se inicia su duplicación. El periodo G2 es el que antecede a la mitosis. En este periodo los cromosomas están ya duplicados, es decir, están formados por dos cromátidas con uniones a nivel del centrómero (Figura 34) (Schafer, 1998).

Durante una división celular típica el núcleo se divide en dos núcleos hijos con la misma información genética. En esta división, el citoplasma y los diferentes organelos celulares quedan repartidos y durante la posterior interfase se producirán nuevos organelos a partir de los que cada célula hija ha recibido. Por consiguiente, en una división celular hay que distinguir dos aspectos: división del núcleo o Mitosis y la división del citoplasma ó citocinesis (Schafer, 1998).

A partir de la fase de mitosis (M), la célula puede entrar de nuevo en la fase G1 y dividirse otra vez o en entrar en la llamada fase G0 en la que sufre una serie de transformaciones que conducen a la diferenciación celular. La duración de los periodos G1, S, G2 y M depende del tipo de célula que se trate. Así, en células del epitelio humano la duración es de 8 horas, en otros

tipos de células puede ser de varios días o incluso meses. También depende de las condiciones fisiológicas y de determinados factores y, en particular, la temperatura (Schafer, 1998).

La proliferación tumoral depende, en gran medida, de la presencia de alteraciones en el control y la progresión del ciclo celular normal (Hanahan y Weinberg, 2000). Los complejos de proteínas asociadas al ciclo celular, compuestos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (cdks), participan en la regulación del ciclo celular. Por otro lado, varios genes supresores de tumores y sus productos proteicos actúan en los puntos de transición de G0/G1, previniendo la pérdida del control y la consiguiente progresión tumoral. Ejemplos de estos mensajeros son: p53, pRB, Mdm2, p21^{Waf-1}, p16^{INK4A} y p14^{ARF} (Cordón-Cardo, 1995; Niida y Nakanishi 2006).

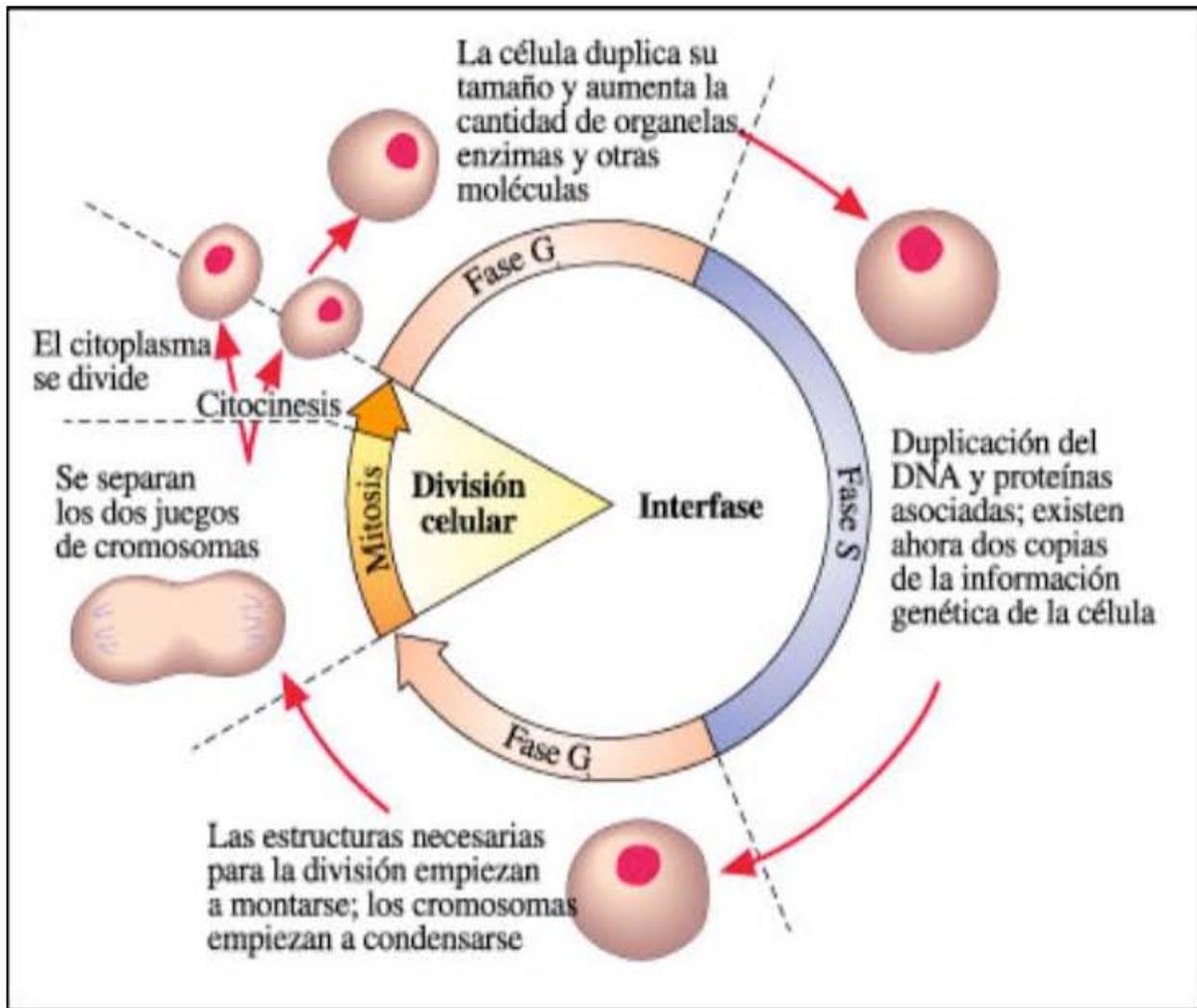


Figura 34. Fases del ciclo celular.

8.1.2 p53 y Mdm2

El gen supresor de tumores p53, localizado en el cromosoma 17p13 se encarga de mantener la integridad genómica cuando hay daño al DNA, causado, por ejemplo, por carcinógenos, radiaciones o quimioterapia. Cuando el daño al DNA es detectado, p53 se libera de su homólogo mdm2 que lo mantiene inactivo. La liberación de p53, el cual es un factor de transcripción inicia una serie de eventos celulares que permitirán a la célula progresar en cuando menos dos vías diferentes: 1) induciendo un arresto en el ciclo celular, permitiendo la reparación del DNA para prevenir la propagación de los defectos genéticos producidos (Lane, 1999; Niida y Nakanishi, 2006). En este evento pueden participar los siguientes factores: p16-ciclina D1-quinasa ciclín-dependiente 4-Rb, que regula la transición del ciclo celular de G1 a la fase S (Gottlieb y Oren, 1996; Niida H y Nakanishi M, 2006); y la vía de p21^{Waf-1}, que produce detención del ciclo celular en G1 o en G2/M, sin afectar la reparación del DNA (Levine, 1997), 2) Si el daño al DNA es muy severo p53 induce muerte celular conocida como apoptosis (Lowe et al., 1993; Niida y Nakanishi, 2006), iniciando la transcripción de genes, por ejemplo de la familia Bcl-2 como; BAX, Noxa y PUMA (Oda et al., 2000; Niida y Nakanishi, 2006).

8.1.3 proteína retinoblastoma

El gen supresor RB (gen del retinoblastoma), que se localiza en el cromosoma 13p, codifica una fosfoproteína llamada proteína retinoblastoma (pRB) que en su forma activa está infrafosforilada y se une al factor de transcripción E2F y lo inactiva evitando el paso a G2/M. Esta forma infrafosforilada es la predominante en G1, ejerciendo un efecto supresor sobre el crecimiento. pRB se fosforila en el inicio de la fase G2 y permanece así en las fases G2 y M favoreciendo la proliferación celular. Es decir, cuando pRB está fosforilado E2F está libre permitiendo la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular como la DNA polimerasa alfa, cdc2 y myc (Xu et al., 1993; Niida y Nakanishi, 2006). De manera que pRb constituye una vía primordial en el control del ciclo celular, al igual que la de p53.

8.1.4 p21^{Waf-1}

p21^{Waf-1} es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas, que previene la fosforilación de proteína retinoblastoma (pRB) y la liberación resultante de E2F, bloqueando de este modo la entrada de las células en la fase S del ciclo celular (Cordon-Cardo, 1995; Niida y Nakanishi, 2006). La expresión de p21^{Waf-1} se encuentra regulada directamente por p53. De hecho, la detención del ciclo celular que desencadena p53 en presencia de daño en el DNA, se efectúa a través de p21^{Waf-1}.

Recientemente se han identificado vías alternativas en las que la expresión de p21^{Waf-1} es mediada independiente de p53, a través de factores de transcripción dependientes de ligando denominados receptores proliferadores de peroxisomas (PPAR) (Han et al., 2004; Niida y Nakanishi, 2006). Este hecho sugiere que a pesar de existir mutaciones en p53, la expresión de p21^{Waf-1} puede estar conservada, y por tanto el control del ciclo celular.

8.1.5 p16^{INK4A/CDKN2} y p14^{ARF}

Productos proteicos de tres genes localizados en la región 9p21, p16 y p15 son quinasas dependientes de ciclinas, con efecto regulatorio sobre el ciclo celular, regulando la fosforilación de pRB. La pérdida de expresión de p16 un inhibidor de la fosforilación, mantiene hiperfosforilada pRB, favoreciendo la proliferación tumoral (Orlow et al., 1995). p14 relaciona las vías de p16/pRB y p53, ya que el gen p14^{ARF} comparte una porción de la unidad de transcripción p16^{INK4A/CDKN2} y codifica una proteína que interacciona con Mdm2, aumentando la disponibilidad de p53 (Niida y Nakanishi, 2006).

8.1.6 Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular que se ha conservado a lo largo de la evolución, el cual, se requiere para el desarrollo normal de los organismos multicelulares desde nematodos hasta mamíferos. El término apoptosis, es un término griego que hace referencia a la caída de las hojas y fue propuesto en 1998 por Kerr y colaboradores. Este proceso involucra muerte celular aséptica y ocurre durante procesos fisiológicos normales como en la metamorfosis

embriogénica, recambio tisular, y atrofia muscular dependiente de factores endocrinos (Jacobson, 1997). La apoptosis también es esencial, en correcto equilibrio con la proliferación, para la renovación de los tejidos que constituyen el organismo (Kerr, 1972). Aunque como cualquier otro programa metabólico ó del desarrollo, la apoptosis puede verse afectada por alteraciones genéticas. De hecho en numerosas patologías humanas desde enfermedades neurodegenerativas hasta cáncer, se han descrito fallos en las vías apoptóticas (Naik, 1996; Vermeulen et al., 2005).

La apoptosis se caracteriza por una combinación de factores extracelulares e intracelulares entre los que destacan los siguientes: encogimiento celular, la integridad de la membrana plasmática, formación de ampollas en la superficie celular, condensación de la cromatina (picnosis), formación de cuerpos apoptóticos, fragmentación nuclear (cariorrhexis), pérdida de contactos celulares (pérdida del citoesqueleto) e invaginaciones en la membrana plasmática (Figura 35) (Chao et al., 1998; Vermeulen et al., 2005).

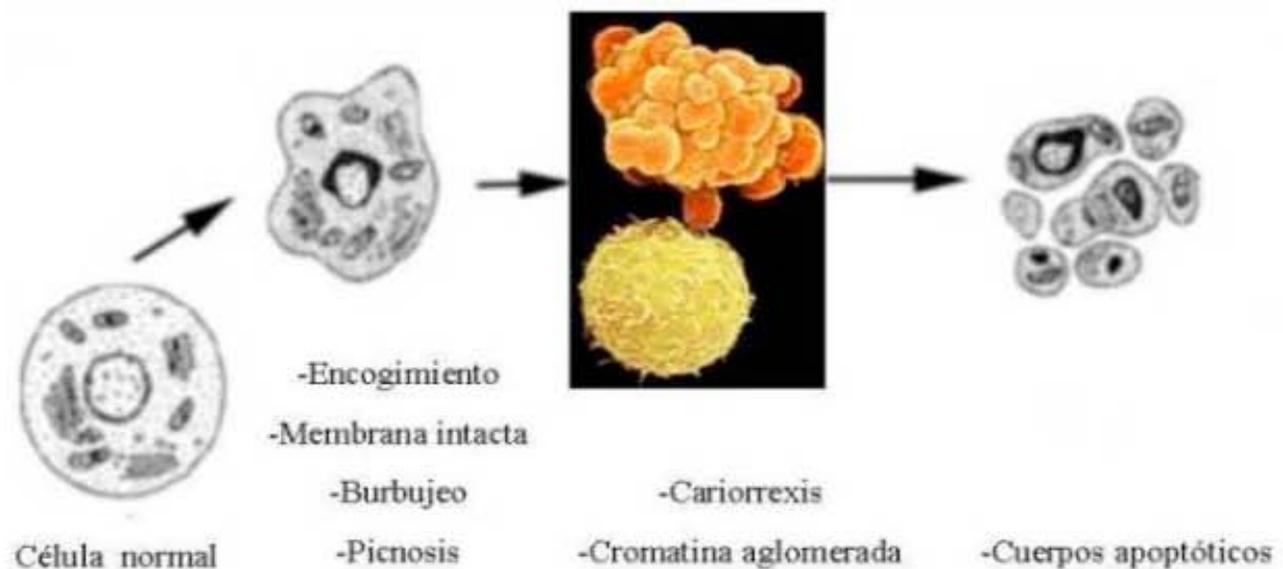


Figura 35. Características particulares de la apoptosis.

Muchos de los componentes de la vía apoptótica se han conservado a lo largo de la escala evolutiva, desde nematodos hasta mamíferos (Vaux et al., 1992; Hengartner y Horvitz, 1994). De manera que el proceso apoptótico es un mecanismo programado genéticamente, altamente complejo y regulado, el cual, independientemente de la naturaleza del estímulo inductor siempre involucra la activación de una cascada de proteasas que desmantela a la célula de forma rápida y controlada, sin causar daños en el entorno celular (Hengartner y Horvitz, 1994).

8.1.7 Factores inhibidores e inductores de apoptosis

El tiempo de vida de las células es resultado de un perfecto equilibrio entre los factores de crecimiento o supervivencia (inhibidores de la apoptosis); y los factores supresores de la viabilidad celular (reguladores inductores) (Tabla 3 y 4). (Hermann, 1995).

TABLA 3. Factores inhibidores de apoptosis

Fisiológicos	Farmacológicos
Factores de crecimiento	Inhibidores de calpaína
Matriz extracelular	Inhibidores de cistein proteasas
Aminoácidos neutros	Promotores tumorales
Zinc	
Estrógenos y andrógenos	

TABLA 4. Factores inductores de apoptosis

Fisiológicos	Relativos	Terapéuticos	Toxinas
TNF (familia)	Infección viral	Rayos gamma	Etanol
Ligando de Fas	Oxidantes		Péptidos
TNF	Radicales libres	Rayos UV	Beta amiloides
TGF beta	Tóxicas bacterianas		
	Genes supresores tumorales (p53, p21/Waf-1, pRB, Bcl-2)	Quimioterapéuticos	
Neurotransmisores	Deprivación de nutrientes		
Glutamato	Oncogenes (<i>myc</i>)		
Dopamina			
Aspartato			
Calcio			
Glucocorticoides			

8.1.8 Reguladores intracelulares

Los principales reguladores intracelulares de la apoptosis son la familia de proteínas Bcl-2 (Hengartner y Horvitz., 1994). En mamíferos está constituida de 28 miembros (Tabla 5) (Chao y Korsmeyer, 1998; Adams y Cory, 1998; Vermeulen et al., 2005) y todos ellos presentan al menos uno de los cuatro dominios conservados de homología a Bcl-2 (BH1, BH2 BH3 ó BH4). Algunos miembros de la familia Bcl-2 inhiben apoptosis y otros la activan (tabla 5), puesto que ambos tipos pueden homo- ó hetero-dimerizar sus concentraciones relativas pueden regular el balance entre muerte y supervivencia (Oltvai et al., 1993). Muchas de estas proteínas presentan un dominio c-terminal hidrofóbico que les permite anclarse a la cara citoplasmática de las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y envoltura nuclear, de forma que pueden registrar daños en dichos órganos (Revisado en Green y Redd, 1998; Vermeulen et al., 2005). Una vez registrado el daño, las proteínas proapoptóticas Bax o Bak forman canales en la mitocondria permitiendo la liberación de factores apoptóticos como citocromo c, AIF, endonucleasa G, Smac/Diablo y Omi/HTRA2 (Revisado en Vermeulen et al., 2005).

Tabla 5. Miembros de la familia Bcl-2

Antiaoptóticos	Proapoptóticos	Proapoptóticos con dominio BH3
Bcl-2	Bax	Bid
Bcl-W	Bak	PUMA
Boo/Diva	Bcl-Xs	Spike
Mcl-1	Bcl-GL	Hrk/DP5
Bfl1/A1	Bfk	Bik/Nbk/Bik
Bcl-XL	Bok/Mtd	Bak
Bcl-B		Bad
		Nix
		Bim/Bod
		BNIP3/nix
		Bmf
		Noxa
		Harakiri

Una vez liberado citocromo c se forma el apoptosoma, que al interactuar con el factor apoptótico (Apaf-1) y procaspasa-9 iniciadora, activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, causando degradación celular y proteólisis de proteínas nucleares (Figura 40). Bcl-2, Bcl- X_L que son proteínas anti apoptóticas, impiden la cascada de apoptosis mediante su acoplamiento con las proteínas proapoptóticas Bax y Bak. Se han descrito también algunos efectos antiapoptóticos directos en la desactivación de las caspasas efectoras (3, 6 y 7) (Cregan et al., 2004).

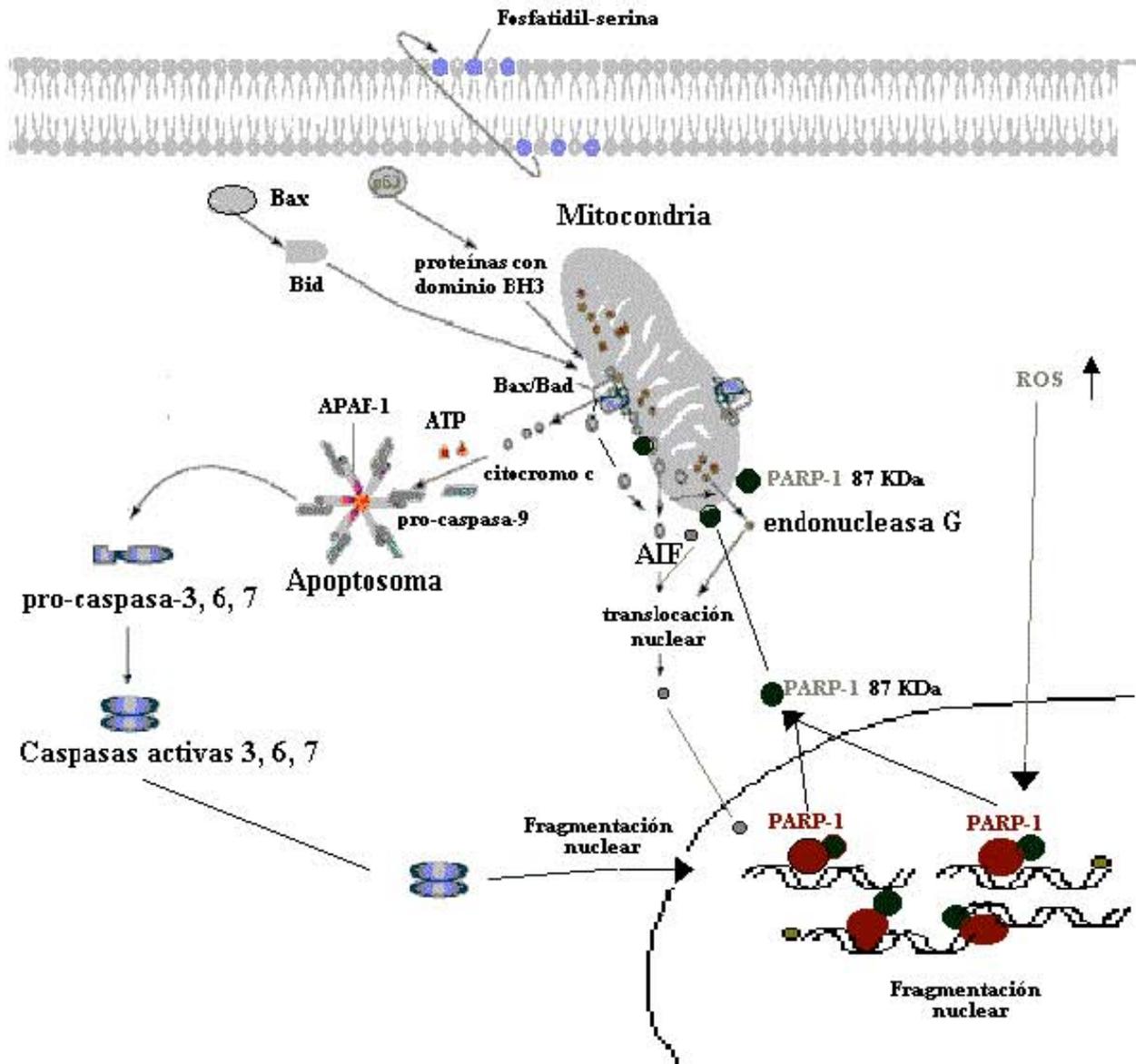


Figura 40. Vía mitocondrial de apoptosis. Se ilustra la vía que involucra muerte celular dependiente e independiente de caspasas mediada por AIF y endonucleasa G.

La liberación de citocromo c de mitocondria, también puede liberar al factor AIF y endonucleasa G, las cuales se translocan al núcleo directamente e inducen fragmentación nuclear independiente de caspasas (Figura 40) (Li et al., 2001; Cregan et al., 2004). AIF también puede ser liberado independientemente de Bax/Bcl-2, a través del fragmento apoptótico de 87 kDa de la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP-1). Cuando PARP-1 es sobreactivada después de un daño severo al DNA, causa poli ADP-ribosilación de muchas proteínas nucleares que usan como sustrato NAD^+ . PARP-1 se une a las roturas del DNA sobreactivándose y depletando los niveles de ATP, causando muerte celular por necrosis. Diversos reportes han demostrado que caspasa-3 y -7 pueden desactivar PARP-1 evitando necrosis celular y manteniendo niveles suficientes de ATP para inducir fragmentación del DNA oligonucleosomal (Rosen et al., 1997). Además la liberación del fragmento apoptótico de 87 kDa de PARP-1 conduce a la liberación mitocondrial de AIF, la cual se transloca al núcleo e induce fragmentación nuclear (Li et al., 2001; Cregan et al., 2004).