



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Neurobiología

“Participación de los receptores que activan la proliferación de peroxisomas en el efecto antineoplásico del yodo en la glándula mamaria”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q. F. B. Rosa Elvira Nuñez Anita

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Carmen Aceves Velasco

Campus UNAM Juriquilla, Querétaro, 2010



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.

Parece paradójico que la investigación científica -en muchos sentidos una de las actividades humanas más inquisitivas y escépticas- dependa de la confianza personal. Y sin embargo, el hecho es que sin confianza no puede funcionar la investigación.

Arnold S. Relman

DEDICATORIA

A mis padres, Elidia Anita y Jose Luis Nuñez

A mis hermanos, Isabel, Graciela, Angel y Roberto

A mis sobrin@s, Gaby, Lizbeth, Itzel, Leslie y Eduardo

A mi otra familia, Benjamín, Alonso y Leonardo

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional

A la Dra Carmen Aceves, por su amistad, confianza, paciencia y apoyo. Por enseñarme a ser una mejor profesionista y persona.

A la Dra Brenda Anguiano, por su amistad y paciencia. Por ser un ejemplo de perseverancia y un apoyo invaluable para mi formación.

Al Dr Marcos Cajero, por su amistad, su apoyo incondicional y confianza. Gracias por tus enseñanzas de vida.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Maria Eugenia Gonsebatt y Dr. Manuel Aguilar. Por sus valiosas aportaciones para el presente trabajo. Por sus consejos y apoyo a lo largo de mi formación profesional.

A los miembros del jurado, Dra. Leticia Rocha. Dr. Emilio Rojas, Dra. Teresa García y Dr. Michael Jeziorski. Por sus comentarios y valiosas aportaciones al presente trabajo.

Al IIAF-CEMB UMSNH, por el apoyo recibido para realizar la estancia de investigación. A mis compañeros y amigos, Luis Antonio, Juan Carlos, Ingrid, Irma, Mónica y Alex.

A mis amigos y compañeros del INB y FATA, Mariselita, Clara, Adriana, Martha Carranza, Gabriel Nava, Celina García, Antonio Prado, Daniel, Brenda Maldonado y Laura Acosta

Agradezco la ayuda y asesoría técnica de Guadalupe Delgado y Felipe Ortíz. Gracias por su ayuda y amistad en las buenas y no tan buenas.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio, Pablo García, Omar Arroyo, Ofelia Soriano, Mario Nava, Yunuén Alfaro, Susana Sosa, Laura Vega, Irasema Mendieta, Paloma Olvera, Eva Delgado, Guillermo Peralta, José Miguel Torres, Silvia Angulo y Nuri Aranda.

A Benjamín Sosa, gracias por tu ayuda, paciencia y cariño. Por lo que falta.

A mis padres, gracias por su amor.....gracias por todo.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Metabolismo energético del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Carmen Aceves Velasco

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y la UNAM.

Donativos PAPIIT/UNAM 201210 y CONACYT 78955. El autor fue apoyado por la beca CONACYT (Número de registro: 203107)

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Doctorado en ciencias Biomédicas.

ÍNDICE.

| | |
|---|----|
| Resumen | 5 |
| Abstract | 6 |
| Introducción | 7 |
| Antecedentes | |
| Captación de yodo en tejidos normales | 8 |
| Yodo y cáncer mamario | 10 |
| Yodolípidos | 12 |
| Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) | 13 |
| Generalidades | |
| Aspectos moleculares de los PPARs | 15 |
| a) Propiedades de unión a DNA | 15 |
| b) Elemento de respuesta (PPRE) | 15 |
| c) Propiedades de unión a ligando | 17 |
| d) Propiedades de transactivación mediadas por PPARs | 18 |
| e) Coactivadores y correpresores de PPARs | 20 |
| Participación de PPARγ en cancer mamario | 22 |
| Estudios <i>in vitro</i> | 22 |
| Estudios <i>in vivo</i> | 24 |
| Hipótesis | 26 |
| Objetivos | 26 |
| Objetivo general | |
| Objetivos específicos | |

Materiales y métodos

| | |
|--|----|
| Cultivo celular | 27 |
| Obtención e identificación de la 6- ¹²⁵ IL | 27 |
| Obtención e identificación de 6-IL | 27 |
| Preparación del DNA radio marcado (PPRE) para ensayos de retardo | 28 |
| Ensayos de retardo | 29 |
| Ensayos de super-retardo | 31 |
| Purificación de plasmidos para transfección | |
| Transformación de células competentes E. coli cepa DH5α | 31 |
| Preparación a pequeña escala de DNA plasmídico | 31 |
| Preparación a gran escala de DNA plasmídico | 32 |
| Transfección transitoria para ensayos de transactivación | 33 |
| RT-PCR tiempo real de PPARs de células MCF-7 y MCF-12F | 34 |
| RT-PCR tiempo real para células MCF-7 tratadas con 6-IL | 35 |
| Western blot de PPARγ | 35 |
| Tinción con Rojo Oleoso para identificar lípidos neutros | 36 |
| Análisis estadístico | 37 |

Resultados

| | |
|---|----|
| Cromatografía en capa fina de 6-IL y 6- ¹²⁵ IL | 38 |
| Ensayos de retardo | 39 |
| Ensayos para análisis de unión de ligando | 39 |
| Ensayos de competencia | 41 |
| Ensayos de super-retardo | 45 |
| RT-PCR tiempo real de PPARs de MCF-7 y MCF-12F | 47 |
| Transactivación del elemento de respuesta de PPARs (PPRE) | 48 |
| RT-PCR tiempo real de PPARs de MCF-7 tratadas con 6-IL | 50 |
| Inmunodetección de PPARγ | 52 |
| Efecto fisiológico de la inducción de PPARγ | 52 |

Discusión 54

Conclusiones 60

Referencias 61

Anexo I

Participación de PPAR α y PPAR β/δ en cáncer mamario 71

Anexo II

Mapa del plásmido PPRE-TK-LUC 74

Anexo III 75

Nuñez Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and Peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. Prostaglandins and other lipid mediators. 2009. 89: 34-42

Anexo IV 84

Nuñez-Anita R.E, Cajero-Juárez M, and Aceves C Peroxisome proliferator-activated receptors. Role of isoform gamma in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. 2010. Enviado a *Current Cancer Drug Targets*

Anexo V 85

Índice de figuras y tablas

Lista de abreviaturas

AA, ácido araquidónico

CDK2, 4 ó 6, cinasas dependiente de ciclina

COX-2, ciclooxigenasa 2

DMBA, dimetil-benzantraceno

DNA, ácido desoxirribonucleico

FAS, sintasa de ácidos grasos

GM, glándula mamaria

I₂, yodo molecular;

MNU, N-metil-N-nitrosourea

NIS, Simportador de yodo-sodio

PBS, buffer de fosfatos

PGJ2, prostaglandina J2

15-dPGJ2, 15-deoxi-prostaglandina J2

PNK, polinucleotido cinasa

PPAR, Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

RNA, ácido ribonucleico

PSA, antígeno específico de prostata

RXR, receptor X de ácido retinoico

6-IL, 6-yodolactona

INTRODUCCIÓN

El yodo es un micronutriente esencial para la vida. La mayoría de los estudios realizados con relación al metabolismo del yodo, tanto en animales como humanos, se han enfocado principalmente a su papel en la función tiroidea. Al igual que los tirocitos, el epitelio mamario, deriva filogenéticamente de células gastroentéricas primitivas concentradoras de yoduro. Sin embargo, el tipo químico de yodo parece ejercer efectos diferenciales en cada tejido. En la tiroides el yoduro (I^-), es eficiente para disminuir el crecimiento anormal de esta glándula, llamado bocio. En contraste el yodo molecular (I_2) es el único efectivo para reducir el tamaño y cantidad de tumores mamarios inducidos por carcinógenos químicos. Además en humanos se ha utilizado el I_2 , como tratamiento para corregir problemas mamarios benignos como la fibrosis.

Se sabe que en la tiroides, el yodo puede ser organificado a la tiroglobulina y bajo ciertas condiciones unirse a lípidos y formar compuestos yodados, llamados yodolactonas. Se han caracterizado varias yodolactonas, pero solo una de ellas la δ -6-yodolactona (6-IL), tienen un efecto antiproliferativo y apoptótico en cultivos de tirocitos. Nuestro laboratorio ha mostrado 1) la formación de 6-IL en tumores mamarios de ratas suplementadas con I_2 , 2) la captación y unión de I_2 a lípidos y proteínas en células tumorales de origen humano (MCF-7) y 3) en estas mismas células la administración de 6-IL genera un potente efecto apoptótico. En este trabajo proponemos que en el efecto antineoplásico del yodo, intervienen los receptores que activan la proliferación de peroxisomas (PPAR), para los cuales la 6-IL sería un probable ligando. Se sabe que los PPAR son factores de transcripción dependientes de ligando, y que están relacionados tanto en procesos de proliferación como de apoptosis. Este trabajo tuvo como objetivos: 1) demostrar *in vitro* la unión específica de la 6-IL a las proteínas PPAR. 2). demostrar *in vivo* la unión 6-IL/PPAR en ensayos de transfección, 3) demostrar que la 6-IL puede regular la expresión de las isoformas de PPAR, y 4) demostrar que la unión 6-IL/PPAR γ promueve la acumulación de lípidos dependiente de ésta isoforma.

RESUMEN

Está bien establecido que el yodo molecular (I_2) ejerce efectos antiproliferativos y apoptóticos en diversas células tumorales. En la línea de cáncer mamario humano MCF-7, el tratamiento con I_2 genera lípidos yodados, semejantes a la 6-yodolactona (6-IL), la cual es derivada del ácido araquidónico (AA), y su administración en dichas células disminuye la proliferación. El AA es un ligando natural de los factores de transcripción conocidos como receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). En este estudio se muestra que la 6-IL es un agonista específico de los PPARs con al menos 6 veces más afinidad que el AA (ensayos de retardo y de transactivación) y que su administración a células MCF-7 induce un aumento en la expresión de la isoforma pro-apoptótica PPAR γ y disminuye la expresión de la isoforma proliferativa PPAR α . Se corrobora además que la unión 6-IL/PPAR γ es funcional ya que concentraciones moderadas de 6-IL induce, en las células MCF-7 la acumulación de lípidos neutros, función característica de la activación de los receptores PPAR γ . Tomando en cuenta lo anterior, nuestros resultados implican a los PPARs en el mecanismo molecular por el cual el I_2 , a través de la formación de la 6-IL inhibe el crecimiento de células de cáncer mamario humano.

ABSTRACT

Recently, we and other groups have shown that molecular iodine (I_2) exhibits antiproliferative and apoptotic effects in both *in vivo* and *in vitro* cancer models. In the human breast cancer cell line MCF-7, I_2 treatment generates iodine lipids similar to 6-iodolactone (6-IL), an arachidonic acid (AA) derivative, and its administration significantly decreases cellular proliferation in mammary cells. Several studies have shown that AA is a natural ligand of nuclear transcriptional factors such as the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), which has been implicated in the regulation of cancer cell proliferation. Our results show that 6-IL is a novel agonist of PPARs with almost 6-fold higher affinity than AA (EMSA assay and transactivation assay). Moreover, in MCF-7 cells treatment with 6-IL induces lipid accumulation, which is accompanied by increased PPAR γ and decreased PPAR α expression. Taken together, our results implicate PPARs in a molecular mechanism by which I_2 , through formation of 6-IL, inhibits the growth of human breast cancer cells.

ANTECEDENTES

Captación de yodo en tejidos normales.

El yodo es encontrado en la naturaleza en varias formas: sales inorgánicas de sodio y potasio, yodo diatómico inorgánico (yodo molecular o I₂) y yodo orgánico monoatómico (tabla 1)

| | |
|----------------------|--------------------|
| Suelo costero | |
| NaIO ₃ | Yoduro de sodio |
| NaIO ₄ | Peryodato de sodio |
| Algas / fitoplancton | |
| KI | Yoduro de potasio |
| NAI | Yoduro de sodio |
| I ₂ | Yodo molecular |
| I ⁻ | Yoduro |
| Agua de mar | |
| I ⁻ | Yoduro |

Tabla 1. Fuentes de yodo en la naturaleza (Adaptado de Patrick, 2008)

El yodo es un elemento esencial para la vida, el cual es captado y metabolizado por animales y vegetales que incluso no poseen glándula tiroides. En el humano cerca del 60-80% del yodo total corporal está concentrado en tejidos no tiroideos y su papel biológico no ha sido aún reconocido (Venturi et al., 2001).

Recientemente se ha postulado que el yodo puede tener una función ancestral como antioxidante en todas las células concentradoras de yodo, que incluyen desde las algas más primitivas hasta los vertebrados más recientes. En el humano la mayoría de los estudios en relación a la captura de yodo se han realizado en la tiroides. En un adulto con un consumo suficiente de yodo, aproximadamente 15-20 mg de yodo es concentrado en la glándula tiroides y en las hormonas tiroideas, sin embargo, recientemente se ha descrito que algunos tejidos extra tiroideos son

capaces de concentrarlo, por ejemplo; estomago, intestino, glándulas salivales, plexos coroideos, próstata, ovarios y glándula mamaria (Aceves y Anguiano, 2009). Las formas químicas del yodo son absorbidas a través del tracto gastrointestinal y son internalizadas a los diferentes órganos por dos mecanismos diferentes: en tiroides se ha descrito que el yoduro (I^-) es activamente internalizado por el transportador de sodio-yodo (NIS) y traslocado hacia la membrana apical por el transportador de aniones conocido como pendrina. Ambos transportadores se han identificado además de en la tiroides, en tejido mamario y prostático tanto en condiciones normales como tumorales (Tazebay et al., 2000; Anguiano et al., 2007; Aranda et al., 2007). En cambio, el I_2 parece ser incorporado por otro transportador aún no identificado pero que utiliza el mecanismo de difusión facilitada (Arroyo-Helguera et al., 2006)

Los mamíferos ingieren el yodo de la dieta en varias formas químicas y su distribución/captación es órgano-específica (Thrall y Bull, 1990). En tiroides el yoduro es organificado a proteínas y lípidos mediante su oxidación por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la enzima tiroperoxidasa (TPO). Este yodo oxidado es acoplado a residuos de tirosina específicos de la proteína tiroglobulina y a lípidos como el ácido araquidónico (Pisarev y Gärtner, 2000). La glándula mamaria lactante tiene la capacidad de concentrar yoduro y organificarlo en la proteína mas abundante de la leche; la caseína. Esta yodación se cataliza por la enzima lactoperoxidasa que se expresa principalmente durante el embarazo y la lactancia (Eskin et al., 1970).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que diversos organos y tipos celulares son capaces de captar I_2 y que esta captación no depende de los transportadores clásicos de yoduro sino que lo hace a través de un mecanismo de difusión facilitada independiente de energía y dependiente de síntesis de proteínas (Arroyo-Helguera et al., 2006; Aceves y Anguiano, 2009). En el caso específico de la glándula mamaria la captación de esta forma química de yodo se presenta tanto en condiciones fisiológicas normales (virgen, gestante, lactante) como patológicas

(cáncer) (Aceves y Anguiano, 2009). Se sabe que la leche materna contiene una concentración de yoduro cuatro veces mayor que el tejido tiroideo. Esta captación diferencial ha sido explicada como un mecanismo evolutivo esencial para la función tiroidea neonatal y consecuentemente para el desarrollo neural normal (Topper y Freeman, 1980), sin embargo la captación del I_2 en periodos no funcionales (virgen) o patológicos (cáncer) no ha sido aún explicado.

Yodo y cáncer mamario.

Se ha propuesto que existen diversos factores asociados a la aparición de cáncer mamario, entre los que destacan los antecedentes genéticos, la historia reproductiva, el ambiente y la dieta (Medina et al., 2004).

Dentro del factor dietético, la ingesta de yodo parece tener gran relevancia, pues el alto consumo de este elemento, esta asociado a la baja incidencia de cáncer en las poblaciones asiáticas. Las algas marinas son un componente esencial en la dieta de estas poblaciones y es una fuente rica de yodo en diversas formas químicas: I^- , I_2 , yodatos, yodo acoplado a proteínas y a lípidos (Cann et al., 2000).

Se sabe que el yodo es importante para mantener la integridad estructural y funcional de la glándula mamaria (Eskin et al., 1995; Aceves et al., 2005). Datos estadísticos muestran que en humanos, se ha asociado un aumento en la incidencia de cáncer mamario con la presencia de hipotiroidismo asociado a la baja ingesta de yodo, aunque esto aún se encuentra en controversia (Smyth, 2003a; Smyth, 2003b; Turken et al., 2003). A nivel experimental en humanos se ha utilizado la suplementación de I_2 para corregir problemas benignos como la fibrosis (Kessler, 2004; Ghent et al., 1993).

Un estudio en mujeres con fibrosis mamaria, muestra que al suplementar con I_2 en un tratamiento por 2 a 24 meses las pacientes presentaron una mejoría significativa, sin mostrar ninguna alteración en la fisiología tiroidea (Ghent et al., 1993). Un laboratorio farmacéutico desarrolló una pastilla compuesta por $NaIO_3$ (yodato) y NaI^- (yoduro de sodio) que en contacto con los ácidos gástricos dan

lugar a la formación de I_2 , esta pastilla se ha utilizado en el tratamiento de padecimientos benignos de la GM dando buenos resultados en un periodo de 6 meses (Kessler, 2004).

El efecto anticancerígeno del I_2 se describió en el modelo de cáncer mamario inducido con dimetil benzantraceno (DMBA). En dicho trabajo se mostró que el tratamiento con extracto de algas Wakame o solución de Lugol (mezcla de I^- y I_2 : 3:1), disminuye el crecimiento tumores mamarios (Funahashi et al., 2001). Estos mismos autores posteriormente reportaron que el extracto de Mekabu, otro tipo de alga, induce apoptosis en la línea celular de cáncer mamario MDA-MB (Sekiya et al., 2005).

En el 2005 nuestro laboratorio demostró que es el I_2 y no el yoduro o las hormonas tiroideas, el responsable del efecto antineoplásico del Lugol. En estos estudios se describe que la suplementación de I_2 disminuye la incidencia, el número y tamaño de los tumores inducidos con metil-nitroso-urea (MNU) y que este efecto incide principalmente en la progresión del cáncer más que en su iniciación, ya que la suspensión del tratamiento redundaba en la reaparición de los tumores (García-Solís et al., 2005). Análisis moleculares mostraron que el efecto antineoplásico incluye mecanismos de arresto celular (p53 y p21), así como la inducción de las vías apoptóticas Bax- caspasas y AIF-PARP1 (Arroyo-Helguera et al., 2008; Aceves et al., 2009). Estos efectos se han corroborado en varias líneas celulares tumorales de origen humano por diversos grupos de investigadores, donde se ha hecho evidente que las células normales son menos susceptibles al efecto apoptótico del yodo (Arroyo-Helguera et al., 2008, Shrivastava et al., 2006; Rösner et al., 2009).

En el caso específico de la próstata, nuestro grupo ha mostrado que el yodo, reduce la proliferación de las células e induce la apoptosis en células dependientes de andrógenos como las LNCap (Arroyo-Helguera et al., 2008; Aranda et al., 2007), Igualmente el grupo de Torremante mostro que el potencial antitumoral del I_2 , puede extenderse a otros tipos de células cancerosas, como son el neuroblastoma, glioblastoma y melanoma. Por el contrario, en células de cáncer de colon o pancreático no se inhibió la proliferación celular (Rösner et al., 2009).

Yodolípidos

Como se mencionó anteriormente el yodo además de ser acoplado a la tiroglobulina para la formación de las hormonas tiroideas, se une a lípidos de cadena larga y su producto es conocido como yodolactonas. Las yodolactonas más activas son derivados yodados del ácido araquidónico (AA) y muestran en cultivos de tirocitos, un potente efecto antiproliferativo y apoptótico (Pisarev y Gartner, 2000). Se tienen pocos datos en cuanto a la función de compuestos que poseen el grupo funcional lactona, se propone que en general estos compuestos podrían tener función de inhibidores de enzimas (DNA polimerasa, complejo ubiquinona oxidoreductasa, DNA topoisomerasa, lipasa pancreática y fosfolipasa A2 citosólica, entre otras) Esta relación estructura-función parecen ser filogenéticamente muy antigua y se presenta en organismos en los cinco reinos (Konaklieva y Plotkin, 2005).

Se ha determinado la presencia de lípidos yodados en la tiroides de diferentes especies de mamíferos. Pero solo una de ellas la 6-IL tiene efectos antiproliferativos y apoptóticos en la glándula tiroides (Langer et al., 2003).

La 6-IL es formada por adición de un átomo de yodo en el doble enlace del ácido araquidónico en la posición 6 (6-yodo-5-hidroxi-ácido eicosatrienoico) (Boeynaems y Hubbard, 1980; Corey et al., 1979). El AA es un ácido graso esencial que se genera a partir del ácido linoleico de los alimentos y es el precursor de una gran variedad de mensajeros intracelulares incluyendo prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina y lípidos yodados como la 6-IL (Aubert et al, 1996). El AA no existe en forma libre en el interior de las células, normalmente se encuentra esterificado en los fosfolípidos de membrana particularmente en la posición C2 de la fosfatidilcolina y del fosfatidil inositol. Su liberación depende de la acción de acilhidrolasas y, en particular de la fosfolipasa C y A2. Una vez liberado el AA es metabolizado en forma rápida hasta obtener sus derivados por acción de sistemas enzimáticos como la ciclooxigenasa, lipooxigenasas y proteínas de la familia de citocromo P-450 (Siso, 1991). La presencia de elevadas concentraciones de AA en

las células está asociada a los procesos tumorales. Efectivamente se ha descrito que varios tipos tumorales humanos y animales presentan concentraciones elevadas de AA y /o sus metabolitos (Aceves et al., 2009, Nicholson et al., 1991).

Datos generados en nuestro laboratorio muestran que los tumores mamarios inducidos con MNU presentan una gran cantidad de AA en comparación con glándulas mamarias normales. Cuando los animales son suplementados con I₂ los tumores generan hasta 15 veces mas concentración de 6-IL que las glándulas normales, sugiriendo que el efecto antineoplásico del I₂ pudiera estar mediado por la formación de este yodolípido (Aceves et al., 2009). La formación de lípidos yodados similares a la 6-IL se corroboró también en células MCF-7, tratadas con I₂ (Arroyo-Helguera et al., 2006), En estas células el tratamiento con 6-IL exógena se acompaña .de un potente efecto antiproliferativo y apoptotico (Arroyo- Helguera et al 2008).

Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)

Aunque hasta la fecha no se conoce el mecanismo molecular por el cual el I₂ ejerce sus efectos, la formación de un lípido yodado a partir de la yodación del AA nos permitio proponer a los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) como un posible mecanismo celular.

Los PPARs son miembros de una superfamilia de factores de transcripción activados por ligando y regulan la expresión de genes involucrados tanto en el control del metabolismo de lípidos, proliferación, diferenciación y apoptosis (Shen y Brown, 2003; Kersten et al., 2000). Pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que incluyen receptores a esteroides, hormonas tiroideas, vitamina D y retinoides. El mecanismo molecular clásico que se ha descrito para los PPARs, consiste en la unión a su ligando en citoplasma, formación del heterodímero con el receptor de ácido retinoico (RXR) y su traslocación al núcleo en donde se unen a sitios específicos en el DNA conocidos como elementos de respuesta para PPARs (PPRE) (Berger y Moller, 2002). Las tres isoformas de PPAR se unen al DNA

como un heterodímero obligado con RXR α , RXR β o RXR γ . El heterodímero PPAR/RXR puede ser activado por ligandos para ambos PPAR o RXR. Se conoce una gran cantidad de ligandos endógenos y sintéticos para los PPARs. Los ligandos endógenos reconocidos para dichos receptores son ácidos grasos esenciales de cadena larga, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido linolenico, prostaglandinas, entre otros. Algunos ejemplos de ligandos sintéticos son los fibratos, las thiazolidinedionas, análogos de prostaglandinas y herbicidas (Shen y Brown, 2003) (Ver tabla No.2). Actualmente se conocen tres isoformas, las cuales están codificadas por diferentes genes: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) y PPAR γ (NR1C3). El dominio de unión al DNA (DBD) de PPAR β/δ y PPAR γ con respecto a PPAR α comparten el 85% de similitud, mientras que con respecto al dominio de unión a ligando (LDB) comparte el 65% de aminoácidos en común en relación a PPAR α (figura 1). Esta relativamente alta divergencia influye en el reconocimiento de ligandos. Aunque en algunos órganos y períodos fisiológicos pueden compartir funciones, la presencia de estos receptores en los diferentes tejidos tiene un efecto fisiológico diferencial.

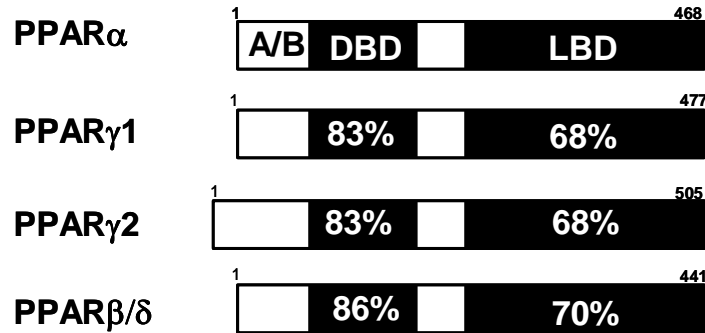


Figura 1. La familia de receptores nucleares PPARs. Comparación de PPARs humanos. Región amino terminal (A/B), dominio de unión a DNA (DBD) y dominio de unión a ligando (LBD). Los números representan el porcentaje de identidad de aminoácidos con respecto a PPAR α . (Adaptado de Willson et al., 2001)

ASPECTOS MOLECULARES DE LOS PPARs.

a) Propiedades de unión a DNA

El dominio de unión al DNA es el más conservado en todos los receptores nucleares. En los PPARs está formado por el dominio de dedos de zinc. Para la unión al DNA las proteínas PPAR requieren de la formación de un heterodímero con el receptor de ácido retinoico (RXR).

b) Elemento de respuesta (PPRE)

La secuencia consenso, es una repetición directa de dos motivos de reconocimiento (hexameros), separados por el nucleótido Adenina. La secuencia consenso del PPRE es la siguiente: 5'- RGGTCA-A-AGGTCA-3'. Se han identificado PPREs en diferentes genes (Ver tabla. 2)

Doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM

| Comparación de secuencias identificadas para PPRE | | | | |
|---|---------|----------|---------------------|-----------------------------------|
| Gene | Especie | Elemento | Secuencia | Función de la proteína |
| Acetil-CoA oxidasa | rata | ACOA | AGGACA-A- AGGTCA | Oxidación peroxisomal |
| | | ACOB | AGGTAC-A- AGGTAC | |
| Acetil-CoA sintasa | rata | ACS (CI) | AGGGCA-T- CAGTCA | Oxidación peroxisomal |
| ALBP/aP2 | ratón | ARE6 | GGGTGA-A- ATGTGC | Proteína de unión a ácidos grasos |
| | | ARE7 | GGATCA-G- AGTTCA | |
| Enzima bifuncional | rata | BIF | AGGTCC-T- AGTTCA | Oxidación peroxisomal |
| Citocromo P450 A1 | rata | CYP4A1 | AGGGTA-A- AGTTCA | ω -oxidación |
| Citocromo P450 A6 | conejo | CYP4A6 | AGGGCA-A- AGTTGA | ω - oxidación |
| Proteína transportadora de ácidos grasos | ratón | FATP | GGGGCA-A- AGGGCA | Transporte de ácidos grasos |
| HMG-CoA sintasa | rata | HMG | GGGCCA-A- AGGTCT | Cetogénesis hepática |
| Lipoproteín lipasa | rata | LPL | GGGGGA- AAGGGCA | Aclaramiento de triglicéridos |
| Enzima málica | rata | MEp | GGGTCA-A- AGTTGA | Transporte de ácidos grasos |
| Carnitin palmitoiltransferasa tipo músculo | humano | MCPT1 | AGGGAA-A- AGGTCA | Transporte de ácidos grasos |
| PEPCK | rata | PCK1 | CGGCCA-A- | Glicerogénesis |

| | | | | | |
|-------------------|----|-------|---------------------|---------------------|--|
| | | | AGGTCA | | |
| | | PCK2 | GGGTGA-A- ATGTGC | | |
| Proteína acoplada | no | ratón | URE1 | TGGTCA-A- GGGTGA | Termogénesis |
| Catalasa | | rata | URE1 | AGGTGA-A- AGTTGA | Detoxificación por H ₂ O ₂ |
| Concenso | | | CTLS | RGGTCA-A- AGGTCA | |

Tabla 2. Comparación de secuencias de PPRES (Adaptado de Girnun et al., 2002).

c) Propiedades de unión a ligando

Los PPARs son capaces de interactuar con una variedad de compuestos, incluyendo algunos compuestos naturales como son los ácidos grasos de cadena larga y una variedad de ligandos sintéticos (Tabla 3 y 4). La figura 2 muestra el mecanismo de activación clásico mediado por la unión a ligando.

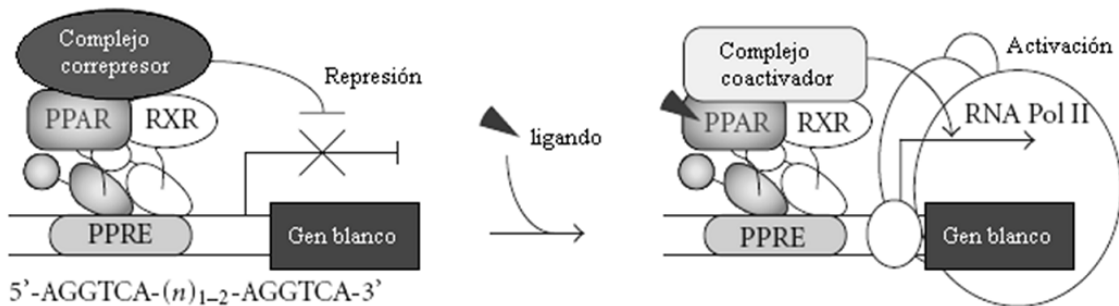


Figura 2. Mecanismo molecular de PPARs. El heterodímero PPAR/RXR se une al elemento de respuesta (PPRE) localizado en la región promotora del gen blanco a través del dominio de unión a DNA. La falta de ligando se asocia con la presencia de un complejo de proteínas correpresoras. En presencia de ligando, el ligando se une al dominio de unión a ligando, esta unión se asocia con el complejo de proteínas coactivadoras. (Adaptado de Tachibana et al., 2008).

d) Propiedades de transactivación mediadas por PPARs

La transactivación de los PPARs resulta de la combinación del complejo proteína (s) PPAR: RXR unida a un PPRE y al ligando. El cambio conformacional de la proteína PPAR ocasionada por su unión a ligando o por otros procesos de activación, como es la fosforilación, se cree que generan una conformación con nuevas superficies de interacción proteína-proteína, las cuales podrían tener contactos específicos con proteína(s) coactivadora(s) (Desvergne y Wahli, 1999).

De hecho, se sabe que PPAR α y PPAR γ son fosfoproteínas. Así como algunos receptores nucleares los PPARs también pueden ser regulados por fosforilación activando el receptor independiente de ligando (Desvergne y Wahli, 1999).

| LIGANDOS NATURALES | LIGANDOS SINTÉTICOS |
|--|--|
| <p>Ácidos grasos insaturados:</p> <p>Ácido araquidónico</p> <p>Alfa y gamma linolenico</p> <p>Eicosapentaenoico</p> <p>Docohexaenoico</p> <p>Linoleico</p> <p>Palmitico</p> <p>Ácidos grasos saturados:</p> <p>Cúprico</p> <p>Laurico</p> <p>Mirístico</p> <p>Palmitico</p> <p>Esteárico</p> <p>Araquidico</p> <p>Eicosanoides:</p> <p>HEPEs (hidroxieicosapentaenoico)</p> <p>Leucotrieno B4</p> <p>14- Prostaglandina J2</p> <p>Ácidos grasos dicarboxilicos</p> | <p>Análogos de prostaglandinas</p> <p>Análogos de leucotrieno B4</p> <p>Antagonistas de leucotrieno D4</p> <p>Agentes hipolipidemicos:</p> <p>Ácido clofibrico</p> <p>Ácido bezafibrico</p> <p>GW 2331 (análogo de fibrato)</p> <p>Acido eicosatetraenoico</p> <p>Agentes hipoglicemiantes:</p> <p>Rosiglitazona</p> <p>Troglitazona</p> <p>Drogas antiinflamatorias no esteroideas:</p> <p>Indometazina</p> <p>Ibuprofeno</p> <p>Fenoprofen</p> <p>Inhibidores de Carnitin Palmitoil transferasa: I</p> <p>2-Bromopalmitato</p> |

Tabla 3. Algunos ligandos naturales y sintéticos de los receptores PPARs (Adaptado de Desvergne y Wahli, 1999)

En los siguientes párrafos se describe principalmente a la isoforma PPAR γ , la cual como se describirá es mediadora del efecto antiproliferativo y apoptótico en cáncer mamario. Además de que es la isoforma en la que se centra la aportación del presente trabajo. La información correspondiente a la participación de las isoformas PPAR α y PPAR β/δ en cáncer mamario se localiza en el Anexo I.

| Ligando PPAR γ | Rango (Efecto) | Clasificación |
|--|----------------|-------------------------------|
| Rosiglitazona Troglitazona Ciglitazona | nM | Agonistas de alta afinidad |
| Prostaglandina J2 13-HODE 15-HETE 6- IL (6-yodolactona) | μ M | Agonistas de mediana afinidad |
| Acido araquidónico Acido linoleico AINES | > μ M - mM | Agonistas de baja afinidad |

Tabla 4. Clasificación de ligandos de acuerdo a su afinidad por el receptor PPAR γ (Adaptado de: Bishop-Bailey y Wray, 2003). En esta tabla se ubica a la 6-IL de acuerdo a los resultados presentados en el presente trabajo.

e) Coactivadores y correpresores de PPARs

Los coactivadores son moléculas reclutadas por receptores nucleares activados por su unión a ligando (u otros factores de transcripción que se unen a DNA) que favorecen el aumento de la expresión de genes. En contraste a los receptores nucleares, los cuales son estructuralmente conservados, sus coactivadores son diferentes tanto en estructura como en la vía en que contribuyen al proceso de

transcripción es decir, a través de diversas actividades enzimáticas como la acetilación, metilación, ubiquitinación y fosforilación o como remodeladores de cromatina. Los coactivadores son efectores esenciales de las actividades biológicas de receptores nucleares y de sus ligandos (Lonard y O'Malley, 2006)

Por el contrario, una molécula correpresora interactúa con los receptores nucleares que no se unen a su ligando y reprime la transcripción. Los correpresores se asocian a proteínas como histonas desacetilasas las cuales favorecen el medio ambiente de la cromatina que se opone a la actividad de promoción de la transcripción. A través de estas acciones opuestas entre coactivadores y correpresores existe un balance que define la magnitud y la naturaleza de la respuesta a ligandos de receptores nucleares (Lonard y O'Malley, 2006). Se conocen algunas moléculas coactivadoras y correpresoras de los PPARs (Ver tabla 5).

| PPAR γ |
|---|
| Coactivadores |
| PGC-2, ARA-70, PGC-1 α , PPARGC1B, CREBBP, p300, CITED2, ERAP140, PPARBP, PRMT-2, PIMT, NCOA1, NCOA2, NCOA3, NCOA6, SWI/SNF y PDIP |
| Correpresores |
| NRIP1, SAF-B, TAZ, NCOR1 y NCOR2 |

Tabla 5. Proteínas coactivadoras y correpresoras de los PPAR γ . (Datos obtenidos de Wilson et al., 2001).

Participación de PPAR γ en cáncer mamario

La mayoría de los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* indican que esta isoforma disminuye la proliferación celular, induce diferenciación y promueve la apoptosis.

El receptor nuclear PPAR γ es expresado en numerosos tipos celulares como son los adipocitos, colon, pulmón, macrófagos y células epiteliales mamarias. Se ha identificado a ácidos grasos de cadena larga como los ligandos endógenos de esta isoforma. También se conoce una gran cantidad de ligandos sintéticos específicos, dentro de estos se encuentra las thiazolideindionas que son un grupo de drogas antidiabéticas como la troglitazona, ciglitazona y la rosiglitazona.

Estudios *in vitro*:

Se sabe que PPAR γ regula de manera indirecta algunos genes relacionados con el ciclo celular, tal es el caso de la ciclina D1, la cual es reprimida en presencia de ligandos de esta isoforma (Wang et al., 2003). Se ha descrito también que ligandos de PPAR γ regulan a la alta a genes como p21 que es un regulador negativo del ciclo celular, y participa en el control de la transición de la fase G1 a la fase S (Han et al., 2004). Se conoce que el gen supresor de tumores p53 regula la transcripción de efectores responsables del arresto celular y de la apoptosis (por ejemplo: p21 y Ciclina D1). Se ha argumentado que los ligandos de PPAR γ tienen sus efectos biológicos vía la regulación directa de p53 a través de la unión a su promotor, uniéndose a elementos de respuesta del factor de transcripción NFK β (Bonofiglio et al., 2006).

Se sabe que la progresión de tumores sólidos y la metástasis son dependientes de la angiogénesis. En este sentido se han realizado estudios en líneas celulares de endotelio humano utilizando ligandos de PPAR γ y se ha observado un efecto angiostático, lo que indica que se evita la invasión a otros órganos (Xin, 1999).

Con respecto al proceso de metástasis, se ha analizado la participación de PPAR γ en células endoteliales. El tratamiento con 15-d-PGJ2 (prostaglandina J2), ligando de PPAR γ en células endoteliales humanas tiene un potente efecto

antiangiogénico, por lo que PPAR γ se considera una molécula blanco importante en el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Xin et al, 1999).

En la tabla 5 se presenta información obtenida de diversos estudios realizados en células de cancer mamario en cultivo, el los cuales es evidente la capacidad de inducir apoptosis por parte de los ligandos de PPAR γ .

| Ligando de PPAR γ | Efecto | Referencia |
|--|--|-------------------------|
| 15dPGJ2 | Inhibe la proliferación de células de cáncer mamario MCF-7, MDA-MB-231, BT474 y T47D | Elstner et al., 1998 |
| Troglitazone | En células en cultivo de tejido mamario murino, previene la carcinogénesis. | Metha et al., 2000 |
| Troglitazone | En células MCF-7 induce arresto celular porque disminuye la expresión de ciclina D1, CDK2, CDK4 y CDK6. | Yin et al., 2001 |
| 2-cyano-3,12-dioxooleano-1,9-dien-28-oico (CDDO) | Induce arresto celular y apoptosis en células MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB 435, a través de la regulación a la baja de Ciclina D1, PCNA y p21. | Lapillonne et al., 2003 |
| Ácido linoleíco conjugado (CLA) | Induce inhibición de la proliferación independiente de la capacidad de respuesta a estrógenos en células de cáncer mamario. | Maggiore et al., 2004 |

| | | |
|-----|--|--------------------|
| CLA | Disminuye la proliferación de las células MCF-7 a través de la vía dependiente de E-caderina y Beta-catenina | Bocca et al., 2007 |
|-----|--|--------------------|

Tabla 6. PPAR γ y cáncer mamario *in vitro*

Estudios in vivo

Tumores inducidos con el fármaco Dimetil- benzantraceno (DMBA):

Estos tumores expresan la tres isoformas de PPAR, siendo la isoforma gamma la más escasa (Tikoo et al., 2009). La terapia temprana con troglitazone en cáncer inducido con DMBA en ratas fue ineficiente en reducir la incidencia y el número de tumores, sin embargo, este mismo agonista de PPAR γ fue efectivo en evitar el crecimiento de tumores malignos, una vez que estos ya estaban formados, además de evitar la formación de tumores adicionales (Pighetti et al., 2001). Coincidiendo con estos datos, se mostró que el tratamiento con agonistas de PPAR γ disminuye el crecimiento de tumores existentes y retrasa la aparición de tumores iniciales o adicionales (Yin et al., 2005)

Tumores inducidos con el fármaco Metil-nitosourea (MNU):

Utilizando este modelo de cáncer, se analizó el efecto de un ligando selectivo para PPAR γ , GW7845, el cual es un análogo de tirosina. Los resultados muestran que el tratamiento previene la incidencia y la cantidad de tumores (Suh et al., 1999).

Ciclooxigenasa-2 (COX-2) parece ser muy importante en mediar los efectos antiproliferativos de los ligandos de PPAR γ . Se observó que hay una disminución en la formación de tumores en los animales tratados con ligandos de PPAR γ , además de un efecto sinérgico cuando los animales son tratados con fármacos inhibidores de COX-2 (Badawi et al., 2004). Aunque el papel de COX-2 en cáncer mamario no es del todo claro, la sobre-expresión de COX-2 se encuentra asociada a la proliferación celular y procesos inflamatorios (Howe et al., 2001). COX-2 es el

paso limitante para la formación de prostaglandinas y éstas se encuentran elevadas particularmente en pacientes que presentan metástasis (Rolland et al., 1980), se ha sugerido que el efecto anticancerígeno de PPAR γ puede ejercerse a través de la inhibición de COX-2 (Badawi et al., 2004).

Xenotransplantes:

En xenotransplantes de células tumorales mamarias MCF-7, la combinación de ligandos para PPAR γ y RAR (receptor de ácido retinoico) se acompaña de la inhibición del crecimiento de tumores y de la inducción de apoptosis (Eltner et al., 1998). Se sabe además que en modelos de cáncer espontáneo en ratones se retrasa la aparición de tumores mamarios cuando se tratan con agonistas selectivos de PPAR γ , este efecto es sinérgico cuando se administra en combinación con el fármaco Celecoxib el cual es un inhibidor selectivo de COX-2 (Mustafa et al., 2008).

Cáncer en humanos:

Se ha relacionado la activación de PPAR γ con un estado menos maligno y mejor pronóstico en cáncer mamario humano. Se ha propuesto que la activación de esta isoforma podría ser resultado de un proceso de diferenciación de las células cancerosas (Mueller et al., 1998).

Por todo lo anterior se considera a PPAR γ estrechamente relacionado con el control de la proliferación celular.

HIPÓTESIS

En el efecto protector del I₂ a través de la formación de la 6-yodolactona, participan los receptores PPARs ejerciendo efectos antiproliferativos y/o de apoptosis.

OBJETIVOS

I.Objetivo general

Determinar la participación de los PPARs, en el efecto antineoplásico de la 6-IL en la línea celular tumoral mamaria MCF-7.

II. Objetivos específicos

- Determinar si la yodolactona es ligando de los PPARs.
- Analizar si la 6-IL es capaz de transactivar al elemento responsivo de los PPARs.
- Analizar el efecto de la 6-IL en la expresión de las isoformas de PPAR en células MCF-7
- Analizar el efecto de la 6-IL en la activación diferencial de la isoforma gamma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se usó la línea celular de cáncer mamario humano MCF-7. Las células fueron cultivadas en cajas petri con medio de cultivo DMEM (GIBCO); 10% de suero fetal bovino (FBS); 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Las células fueron mantenidas en estufa a 37 °C en 5% de CO₂.

Obtención e identificación de la 6-¹²⁵IL

La síntesis e identificación de la 6-¹²⁵IL, se realizó por el método de Corey (Corey, 1979; Arroyo-Helguera., 2008). Brevemente, se preparó una mezcla con los siguientes componentes: 10 μ l de cloramina T (1:500 en PBS), 0.5mCi de Na¹²⁵I y 40 mg de ácido araquidónico, agitación por 24h a 4°C, y protegido de la luz. A la mezcla anterior se le adicionó 10 ml de H₂O y se realizaron 4 lavados con 10 ml de diclorometano. Se recuperó la fase orgánica y esta se transfirió a un recipiente con sulfato de sodio, después de 24h a 4°C, se filtro la solución en papel Whatman 41, se evaporó con gas nitrógeno y finalmente la mezcla de yodolípidos fue separada por cromatografía en columna (silica gel 230-400 μ m) (Still et al., 1978). La elusión se realizó con diclorometano. Se colectaron 20 alícuotas de 5 ml cada una. Los compuestos yodados fueron identificados por cromatografía en capa fina en silica gel y una la fase móvil (solvente) de diclorometano-metanol en proporción (97.5:2.5) respectivamente. La 6-¹²⁵IL, fue resuspendida en metanol. La presencia de la 6-¹²⁵IL fue revelada con I₂ y la marca radiactiva mediante el Storm 860 scanner.

Síntesis e identificación de 6-IL (yodolactona no marcada)

La síntesis e identificación de la 6-IL, se realizó por el método descrito por Pisarev y Monteagudo (Monteagudo et al., 1990). Brevemente, se realizó una mezcla con los siguientes componentes: 156 mg de I₂ y 8 ml de acetonitrilo anhidro (mezcla A).

Seguido de agitación 5 min. Aparte disolver 40 mg de ácido araquidónico en 800 μ l de acetonitrilo (mezcla B), adicionar la mezcla B a la mezcla A. Continuar agitación por 24h a 4°C, y proteger de la luz. Pasado este tiempo adicionar tiosulfato de sodio para clarificar (aprox. 7 ml). Volcar en 20 ml de agua destilada. Extraer 4 -5 veces con diclorometano. Reunir las fases orgánicas. Lavar con un volumen de agua destilada. Secar la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro. Reposar 10 h a 4°C. Filtrar en Whatman 41, evaporar con gas nitrógeno y finalmente separar los lípidos de la mezcla por cromatografía en columna (silica gel 230-400 μ m) (Still et al., 1978). La elusión se realizó con diclorometano se colectaron 20 alícuotas de 5 ml cada una. Los compuestos yodados fueron identificados por cromatografía en capa fina en silicagel, la fase móvil (solvente) fue diclorometano-metanol (97.5:2.5). El producto principal fue el esperado, la 6-IL. El AA no acoplado al yodo se separó mediante cromatografía en capa fina. La 6-IL fue resuspendida en etanol absoluto. La presencia de la 6-IL fue revelada con vapores de I₂.

Preparación del DNA radio marcado (PPRE) para ensayos de retardo.

Ambos oligos sentido y antisentido (se muestra la secuencia en el párrafo más adelante), que corresponden al elemento PPRE de los PPARs, fueron marcados de la siguiente manera: Se realizó una mezcla con 20ng de cada oligonucleotido, 2 μ l de buffer de polinucleotido kinasa (PNK 10x), 0.5 μ l de T4 polinucleotido kinasa y 1.5 μ l de gamma-³²P-ATP y agua para un volumen final de 20 μ l. Seguido de incubación 1h a 37°C. Cada cadena de DNA fue purificada, en una columna de Sephadex G25 (SIGMA), para eliminar el fósforo no incorporado al DNA. Se adicionó un volumen apropiado de buffer TE IX (buffer TE: 10mM Tris-HCl pH 7.4 y 1mM EDTA pH 8) a cada cadena y fueron combinadas e incubadas 5 min. a 97°C, posteriormente se dejaron a temperatura ambiente (TA) para su alineación. Así el DNA doble cadena esta listo para ser usado.

Ensayos de retardo.

El principio de este método se basa en que la unión de una proteína al DNA migra más lentamente en un gel de electroforesis, que el fragmento de DNA solo (<http://www.celldeath.de/apometh/emsa.html>)

Se diseñó un fragmento de DNA sintético de 49 pb, que corresponde a la secuencia del elemento de respuesta (PPRE) de las proteínas PPARs: sentido 5'GATCCAGGGAAAAGGTCATCAGGGAAAAGGTCACTAGGGAAAAGGTCAC-3' y antisentido 5'-TCG AG TGACCTTTTCCCTAGTGACCTTTTCCCTGA TGACCTTTT-CCCTG 3' (subrayadas las 3 secuencias PPRE). Este elemento de respuesta fue identificado en el gen humano de carnitina palmitoiltransferasa (Girnun et al., 2002). Este fragmento de DNA se utilizó para demostrar que la 6-IL, tiene afinidad por las proteínas PPAR unidas a su elemento de respuesta. Se han identificado y reportado previamente las secuencias genéticas de algunos elementos responsivos a PPAR como el aquí empleado (Girnun et al., 2002).

Para los ensayo de retardo en gel de poliacrilamida nativo, se utilizaron preparaciones de extractos proteicos (crudos) citoplásmicos y nucleares de células MCF-7. La preparación de estos extractos celulares, se obtuvieron como se describe en Andrews y Faller (1991). Brevemente, las células fueron resuspendidas en 1.5 ml de buffer de fosfatos frío (PBS), y transferidas a un tubo eppendorf. Las células se centrifugaron 5 min. a 500 x g a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µl de buffer A, por cada 10 millones de células (buffer A: 0.32 M de sucrosa; 10mM de Tris HCl pH 8; 3mM de CaCl; 2mM de MgOAc; 0.1mM de EDTA; 0.5% NP-40; 1 mM de dithiothreitol; 0.5 mM de PMSF). La solución se centrifugo 5 min. a 500 x g a 4°C y se recuperó el sobrenadante que corresponde a la fracción citoplásmica. La pastilla fue resuspendida suavemente con 1 ml de buffer B (buffer B: igual que el buffer A pero sin NP-40). Esta pastilla (núcleos celulares) fue centrifugada 5 min. A 500 x g a 4°C y el sobrenadante fue desechado. La pastilla fue resuspendida suavemente en

un volumen de Buffer C de 30 μ l (buffer C: 20mM HEPES pH 7.9; 1.5mM de MgCl₂; 20mM de KCl; 0.2 mM de EDTA; 25% de glicerol; 0.5mM de DTT y 0.5mM de PMSF). Al tubo anterior se adicionó un volumen igual de Buffer D (buffer D: 20mM de HEPES pH 7.9; 1.5mM de MgCl₂; 1% de NP-40; 0.5 mM de DTT; 0.5mM de PMSF).

Para observar la formación de los complejos DNA/proteína y DNA/proteína/6-IL se utilizó un gel nativo de poliacrilamida-TBE al 6%. Polimerizado el gel, este se premigró 2h a 120V a temperatura ambiente. Se realizó la incubación de los componentes 1 h a temperatura ambiente usando el buffer de unión (25 mM de HEPES pH 7.9; 2mM de EDTA; 1mM de DTT 0.1 M KCl). Los componentes de cada reacción de unión son: 1 μ g de Poly-dIdC, buffer de unión, extractos celulares, según el caso citoplásmicos o nucleares (5-10 μ g de proteína), DNA marcado con gamma-³²P-ATP (20 ng) y H₂O para un volumen final de 20 μ l. Cuando fue necesario se adicionó a la reacción de unión 6-¹²⁵IIL y/o 6-IL. También se adicionó ácido araquidónico cuando fue requerido.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 6 %, en buffer TBE 0.5X a 120 V por 2 h a temperatura ambiente.

Se realizaron ensayos de retardo para análisis de competencia, como controles de especificidad. Se utilizó el mismo protocolo que el descrito con anterioridad. Para competencia con *wt*PPRE no marcado se adicionó a la reacción de unión un exceso molar de 25, 50 y 100 veces de éste, 15 min antes de adicionar el *wt*PPRE radiomarcado.

Así mismo, se realizó la competencia con otro fragmento de DNA doble cadena que corresponde al PPRE con la sustitución de 2 nucleótidos, las cuales se a descrito son indispensables para el reconocimiento PPRE-PPAR, el cual se identifica como *mut*PPRE. Se adicionó a la reacción de unión un exceso molar de 25 y 50 veces el *mut*PPRE 15 min antes de adicionar el *wt*PPRE radiomarcado. La secuencia para *mut*PPRE es la siguiente: sentido 5' – AGTGAA

CAGGTCATCAGTGAACAGGTCAGTACTAGTGAACAGGTC-3' y antisentido 3'- TCACTTGTCCAGTACTAGTCACTTGTCCAGTACTGATCACTTGTCCAGT-5'.

Ensayos de super retardo

Se realizaron ensayos de super retardo, utilizando el mismo protocolo que para los ensayos de retardo. A la mezcla de reacción se adicionaron anticuerpos policlonales que corresponden a las isoformas de las proteínas PPARs (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo anti-PPAR α ó anticuerpo anti-PPAR β/δ ó anticuerpo anti-PPAR γ ó la mezcla de los tres anticuerpos de PPAR ó el anticuerpo IgG anti-rabbit, éste último como control negativo.

Purificación de plásmidos para transfección

Para obtener DNA plasmídico en cantidades suficientes para realizar las transfecciones se realizó la siguiente serie de pasos, a partir de una cantidad de DNA plasmídico de 50 nM PPRE-3XTK-LUC, donado por el Dr Ronal M. Evans.

a) Transformación de células competentes E. coli cepa DH5 α

Se realizó el protocolo basado en la inducción de choque térmico, en el cual se induce un estado transitorio de "competencia" en las bacterias recipientes, durante el cual son capaces de internalizar DNAs a partir de una fuente. Brevemente, se adicionó el DNA plasmídico [50nM] en 50 μ l de bacterias. Incubar 30 min en hielo. Seguido de incubación 45 seg a 42°C. Inmediatamente incubar 2 min en hielo. Adicionar 1ml de medio Luria líquido (Medio de crecimiento para bacterias). Incubar 1 hora a 37°C. Sembrar en placas de cultivo con medio Luria sólido adicionado de ampicilina [1 μ g/placa]. Crecer a 37°C toda la noche.

b) Preparación a pequeña escala de DNA plasmidico

Se realizó la obtención y purificación de los plasmidos para posteriormente analizar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa, se realizó el método reportado previamente (Sambrook et al., 1989). Brevemente, transferir una sola

colonia de bacterias transformadas en 3 ml de medio Luria líquido, adicionar ampicilina [50 µg/ml]. Incubar a 37°C toda la noche, en agitación vigorosa. Centrifugar 2500 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante. Resuspender el botón en 100 µl de solución I (50 mM de glucosa; 25 mM de Tris-HCl; 10 mM de EDTA). Adicionar 200 µl de solución II (0.2 N de NaOH; 1% de SDS). Mezclar por inversión. Adicionar 150 µl de solución III (5 M de acetato de potasio 60 ml; ácido acético glacial 11.5 ml; Agua 28.5 ml). Dar vortex y almacenar 5 min en hielo. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min. Transferir en sobrenadante a tubo nuevo. Adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto. Almacenar 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante y resuspender el DNA plasmídico en un volumen apropiado de agua. Realizar electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en buffer TAE 1X. Teñir con bromuro de etidio. Observar la integridad del DNA plasmidico en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X. Se observó una sola banda de DNA que corresponde con el peso molecular del plasmido obtenido (Anexo I. mapa de plasmido pRL-TKLUC en el que se indica el sitio de clonación del PPRE)

c) Preparación a gran escala de DNA plasmídico

Se utilizó un método previamente reportado para obtener DNA plasmídico de buena calidad y cantidad (Sambrook et al., 1989). Transferir 2 ml de bacterias transformadas en 500 ml de medio Luria líquido, conteniendo una cantidad apropiada de ampicilina [50 µg/ml]. Incubar a 37°C toda la noche, con agitación vigorosa. Transferir a tubos falcon de 50 ml. Centrifugar a 3,500 rpm por 15 min a 10°C. Desechar el sobrenadante. Adicionar 18 mL de solución I, reposar 5 min a T° ambiente. Adicionar 18 mL de solución II, reposar 5 min a temperatura ambiente. Adicionar 18 ml de solución III, reposar 5 min a temperatura ambiente. Filtrar en fibra de vidrio con ayuda de un embudo. Recibir cada 20 ml del filtrado en tubo falcón de 50 ml. Adicionar un volumen de isopropanol y reposar 20 min a temperatura ambiente. Homogeneizar por inversión. Centrifugar a 4,000 rpm por 25 min y descartar el sobrenadante. Resuspender en 750 µl de etanol al 70% frío 2

veces. Recuperar en eppendorf de 1.5 ml. Centrifugar 12,000 rpm por 4 min y desechar el sobrenadante. Resuspender en 650 μ l de agua, dar vortex. Centrifugar a 12,000 rpm por 4 min. Recuperar el sobrenadante. Adicionar 5 μ l de RNAsa [5 μ g/ μ l]. Dar vortex. Incubar 1 h en baño maria a 37°C. Adicionar un volumen de PEG 8000 (polietilenglicol al 13% + NaCl 6M). Incubar a temperatura ambiente 5 min. Centrifugar a 12,000 rpm por 15 min. Desechar el sobrenadante y lavar el botón con 1 ml de Etanol al 70% frío. Evaporar el etanol a temperatura ambiente. Resuspender el 1 ml de buffer TE 1X (pH 7.4). Cuantificar 5 μ l de DNA + 1 ml de agua a una longitud de onda de 260 nm en espectrofotómetro.

Transfección transitoria de células MCF-7 para ensayos de transactivación

Se realizó transfección por el método de fosfato de calcio (Ca_2PO_4), este método de transferencia de DNA a células recipientes es comúnmente usado y se basa en la coprecipitación del DNA de interés con fosfato de calcio. Con esta técnica el DNA es internalizado en el citoplasma de la célula por endocitosis y posteriormente es transferido al núcleo (Sambrook et al., 1989).

El día anterior a la transfección, sembrar 120,000 células MCF-7 por placa (placas para cultivo de 35 mm. de diámetro). Para tener una confluencia entre 50 y 60%.

Por cada placa de células sembradas, colocar en un tubo eppendorf 6 μ g de plásmido PPRE-3X-TKLUC ó TK-LUC, adicionar 25 μ l de CaCl_2 [2.5 M] y el volumen necesario de H_2O pH 7 para un volumen final de 250 μ l. Dar vortex. Adicionar 250ml de la solución HBS 2X, gota a gota (HBS: 10mM KCl, 12 mM D-Glucosa, 1.5 mM Na_2HPO_4 , 50 mM HEPES , 280 mM NaCl, pH 7). Reposar 5 min. Agregar gota 250 μ l a cada pozo. Incubar 10h a 37°C en atmósfera de CO_2 . Transcurrido este tiempo, parar la reacción cambiando el medio a las células. 24 horas después de la transfección se adicionan los tratamientos con AA ó 6-IL ó etanol (vehículo), se incuban nuevamente 24 horas. Pasado este tiempo se recuperan las células usando 100 μ l de buffer de lisis de luciferasa 1X (Luciferase Kit, PROMEGA). Seguido de vortex y alternando 5 min a 37C y 5 min a -70C.

Seguido de centrifugación 2 min a 12,000 rpm. Recuperar el sobrenadante. Leer la luz emitida en Luminometro 20-20 (TURNER BIOSYSTEM, CA, USA), adicionar justo antes de la lectura 80 µl de Luciferina (sustrato) (Luciferase Kit, PROMEGA) por cada 20 µl de muestra. El Luminometro debe programarse para 10 segundos de integración. Los resultados son corregidos por cantidad de proteína total, la cual es determinada por el método de Bradford.

RT-PCR tiempo real de PPARs de células MCF-7 y MCF-12F

Análisis de la expresión basal de mRNAs de los PPARs en células no tumorales MCF-12F y tumorales MCF-7.

Se sembraron células MCF-12F ó MCF-7, 120,000 células por pozo. Una vez adheridas al plato de cultivo se incubaron por 24h en condiciones estándar de cultivo. Después de la incubación se realizó la extracción de RNA total usando el reactivo de TRIzol (Life technologies, Inc) según las indicaciones del fabricante. Se realizó transcripción inversa con dos microgramos de RNA total usando el sistema Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen total de 20 µl. La PCR se realizó en el termociclador Roto-gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) usando SYBR green como marcador de amplificación de DNA. La reacción se realizó con 1 µl de cDNA como templado y el kit qPCR supermix-UDG (Invitrogen). Se usaron 40 ciclos de tres pasos de amplificación (94°C por 30 s, 55–58°C por 30 s, 72°C por 30 s) y se utilizarón oligos específicos, Ver tabla en párrafos siguientes. La PCR generó solo el amplicon específico, lo cual se demostro en cada caso por la temperatura de alineación y se realizó electroforesis de 5 µl los productos de PCR en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio en buffer TAE 1X. No se observaron productos de PCR en ausencia de templado. La expresión del gen fue calculada usando el método de Threshold (Dct) y normalizado para el contenido de un gen constitutivo o no regulado (housekeeping). Todas las mediciones se realizarón por triplicado.

RT-PCR tiempo real de PPARs de células MCF-7 en presencia de 6-IL.

Análisis de la expresión de los mRNAs de los PPARs en presencia de 6-IL. Se suplemento a las células MCF-7 con 6-IL como sigue: una vez adheridas al plato de cultivo se realizarón los tratamientos con 6-IL [1µM] o vehículo (etanol) y se incubaron por 24 h en condiciones de cultivo. Después de la incubación se realizó la extracción de RNA total, seguido de RT, para ser analizado por PCR en tiempo real. Se siguió en mismo protocolo descrito anteriormente. La tabla siguiente muestra la secuencia de los oligos utilizados para dicho análisis.

| sentido/antisentido (5' at 3') | | Temperatura de alineación (°C) | Referencia |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------|
| PPARα | CATTTTAGTGACTACTGTGGTTTCC | 62 | GenBank: 624622R10075 |
| | CAGCATTCAGGAAAACGGTT | | |
| PPARβ/δ | GTCGCACAACGCTATCC | 62 | Fauti et al., 2006 |
| | CTCCGGGCCTTCTTTTTGGTCA | | |
| PPARγ | TCTCTCCGTAATGGAAGACC | 62 | Terashita et al., 2002 |
| | GCATTATGAGACATCCCCAC | | |
| β-actin | CCATCATGAAGTGTGACGTTG | 55 | Anguiano, 2007 |
| | ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA | | |

Tabla 7. Secuencia de oligonucleotidos para PCR de los PPARs.

Western Blot de PPARγ.

Análisis de la expresión de la proteína de PPARγ en presencia de 6-IL. En este método se utiliza un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés. Un segundo anticuerpo, acoplado a una enzima (peroxidasa), y contra la especie en la que se produjo el primero, éste último produce una señal que puede ser detectable (quimioluminiscencia).

Las células MCF-7 fueron tratadas con 24 horas con 6-IL, posteriormente fueron lisadas usando 200 µl de buffer RIPA (50mM Tris pH 7.4, 0.5% NP-40, 100 mM NaCl, 1 mM de PMSF, 1 µg /ml de aprotinina), seguido de centrifugación a 12,000 rpm por 2 min a 4°C. El contenido de proteína se determinó por el método de

Bradford. 100 µg de proteínas se separaron en un gel SDS-poliacrilamida al 12%, se transfirió a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se bloquearon las membranas durante 2 horas con leche descremada al 5% en buffer TTBS (100 mM Tris, 2.5 M NaCl pH 7.5, EDTA y 0.05 % tween 20). Después de 3 lavados de 10 min con TTBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal contra PPAR γ (Diluido 1: 1000 en TBS con 5% de leche) ó con el anticuerpo contra la proteína que no cambia su expresión, actina (Diluido 1:3000, en TBS con 5% de leche). Seguido de 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS. Seguido de incubación con anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rabano (Diluidos 1:3000). La señal se detectó por quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosys). Los valores de actina fueron utilizados para normalizar los valores de PPAR γ . El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el software ImageQuant TL v2005.

Tinción con rojo oleoso para identificar lípidos neutros. Análisis de la acumulación de lípidos por tinción con Rojo Oleoso. El colorante rojo oleoso se une específicamente a lípidos neutros, ejemplo de estos son los triacilgliceridos.

El número de células con que se inicia el tratamiento depende del número de días en que se desee mantener el cultivo (para 5 días de tratamiento y teñir al sexto día, se recomienda iniciar con el 15 - 20% de confluencia).

Las células MCF-7 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM al 10% de SFB en camaras de cultivo montadas sobre un portaobjetos de vidrio (Nalge Nunc Int, USA), el medio de cultivo fue suplementado con los siguientes tratamientos: etanol (vehículo), Rosiglitazona [5 µM], AA [30 µM] o 6-IL [5 µM] durante 5 días. El sexto día para examinar la acumulación de lípidos, se aspiró el medio de cultivo, se lavó una vez con PBS y se fijó con paraformaldehído al 2% por 20 min. Seguido de tinción con rojo oleoso, se adicionó la cantidad mínima de rojo oleoso para cubrir las células (300 µl/pozo), se incubó 4 horas a temperatura ambiente. Seguido de lavado con PBS 4 a 5 veces. Se observarán al microscopio óptico y se fotografiaron.

Análisis estadístico.

Los datos analizados corresponden al menos a tres experimentos independientes por triplicado y son expresados como desviación estándar. Las diferencias entre grupos fueron analizadas usando ANOVA de una vía y tukey como prueba post hoc. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con $p < 0.05$.

RESULTADOS

La 6-IL y la 6^{125} IL no se obtienen comercialmente por lo que deben ser sintetizadas en el laboratorio. Para la identificación de la 6-IL se realizó cromatografía ascendente en capa fina (TLC), en cromatofolios de sílica (sílica gel 60 mesh). En la figura 1, se observan dos marcas indicadas por las flechas: una correspondiente a la 6-IL o 6^{125} IL y otra correspondiente al AA. El cromatofolio A y C fueron revelados con vapores de yodo, posteriormente el cromatofolio A fue expuesto en una pantalla amplificante y observado en un escanner (Storm 860 phosphoimager), el cromatofolio B muestra una única marca correspondiente a la 6^{125} IL. Lo anterior confirma la identidad de estos componentes. Como se observa, tanto la 6-IL como la 6^{125} IL tienen el mismo desplazamiento a partir del punto de origen (Mezcla de elusión 97.5:2.5 diclorometano, metanol). En el panel derecho se muestran las estructuras correspondientes a la 6-IL y al AA.

Apartir de esta síntesis, la 6-IL, la 6^{125} IL fueron utilizadas para los experimentos que se describen en párrafos más adelante.

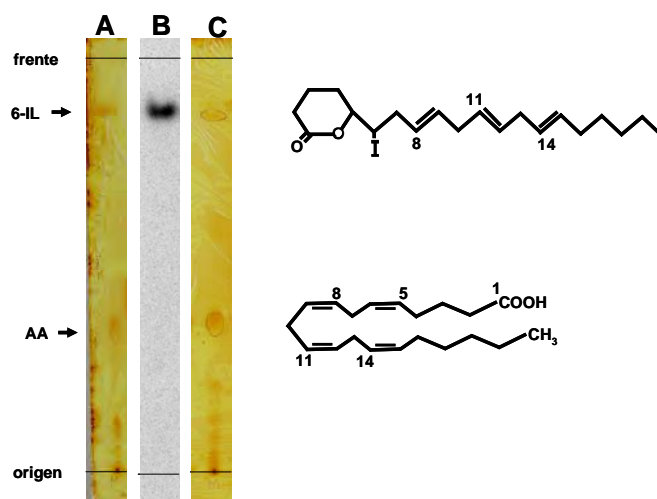


Figura 3. Cromatografía en capa fina para identificar a la 6-IL y AA. Columna A, 6^{125} IL y columna C, 6IL cromatogramas revelados con vapores de yodo. Cromatograma B autoradiografía de 6-IL marcada con 125 I. Estructura química de 6-IL y de AA respectivamente.

Ensayos de retardo

El primer objetivo de este trabajo consistió en determinar si la 6-IL se une a los PPARs, para lo cual se realizaron ensayos de retardo electroforético (EMSAs). Estos ensayos consisten en una electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (nativa) para determinar la presencia de proteínas de unión a DNA. Se utiliza como fuente de DNA, un fragmento de DNA doble cadena que corresponde al elemento de respuesta de los PPARs (PPRE) (reportado previamente en la literatura). Para ser identificado, dicho PPRE fue marcado radiactivamente con ^{32}P . Se usaron además, extractos nucleares y citoplásmicos obtenidos de células de cáncer mamario humano MCF-7. Además de 6-IL, 6- ^{125}I IL obtenida en el laboratorio y el AA se utilizó como control puesto que se sabe se une a los PPARs. La 6-IL no se une a PPARs de la fracción nuclear (datos no mostrados), se sabe que cuando los PPARs se encuentran en núcleo ya están unidos al ligando.

En la figura 4A se muestra un gel que corresponde al ensayo de retardo con proteínas citosólicas. El carril en el que solo se adicionó el ^{32}P PPRE se desplaza más rápidamente, mientras que en los carriles restantes en los que se adicionaron los extractos citoplásmicos, se observa la aparición de un complejo más retrasado. Llama la atención que cuando se adiciona la 6-IL y el AA no se retrasa más la aparición del complejo, por lo que para poder identificar la presencia de la 6-IL en este complejo fue necesario utilizar la 6- ^{125}I IL y el PPRE no radiomarcado. El último carril muestra el complejo formado por el PPRE/PPAR/6- ^{125}I IL.

En la figura 4B se muestra que a medida que se incrementa la concentración de 6-IL, aumenta la intensidad del complejo. Lo anterior muestra que la unión de la 6-IL a los receptores PPARs es lineal, lo cual también se evidencia en el análisis densitométrico (figura 4C)

Para estimar el tamaño del complejo obtenido (peso molecular), se realizaron los cálculos para comparar con respecto al peso del probable ligando. En la Tabla 8 se comparan los pesos moleculares de los PPARs, 6-IL y AA. Estos datos muestran que el heterodímero PPAR/RXR es alrededor de 300 veces más pesado en comparación con el peso del ligando solo. Lo que concuerda con nuestro resultado

en el que la presencia de AA y 6-IL son incapaces de retrasar la aparición del complejo.

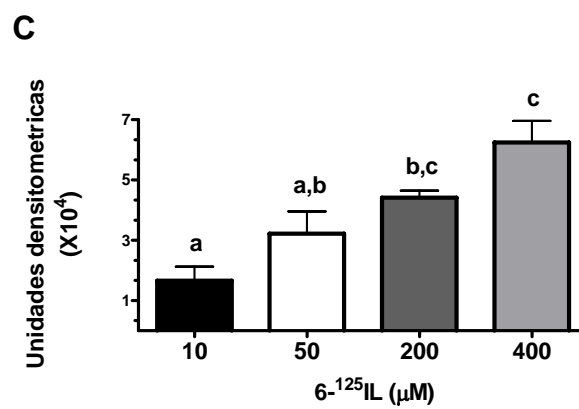
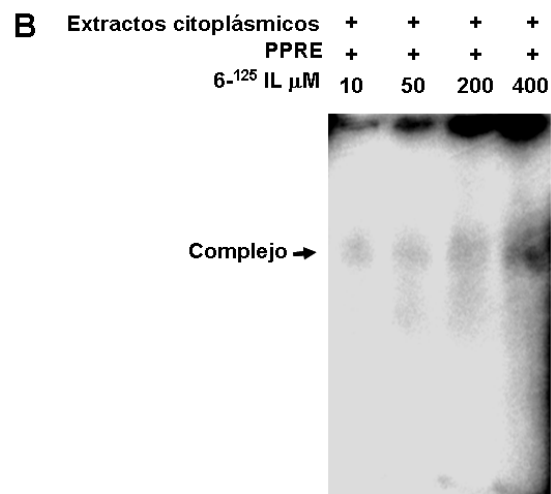
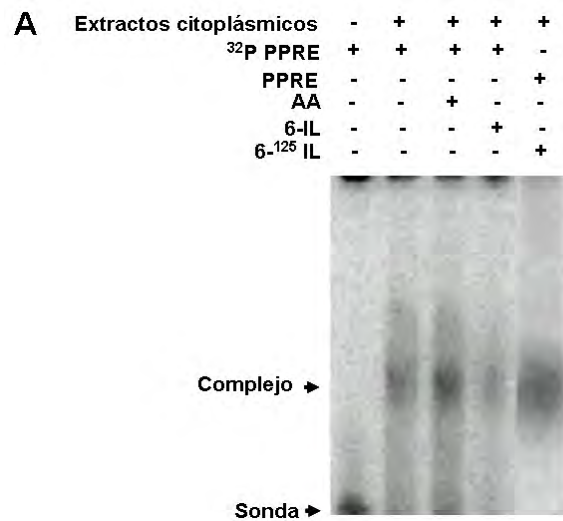


Figura 4. EMSA para determinar la unión de la 6-IL a los PPARs. A, EMSA en el que se muestra que la 6-IL es capaz de unirse al complejo PPAR/RXR/PPRE. En la última columna la marca radiactiva proviene de la 6-¹²⁵IL. B, La unión de la 6-IL al complejo proteínas PPAR/RXR/PPRE es proporcional. A mayor concentración de 6-IL aumenta la marca radiactiva. C, Análisis densitométrico de B, diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

A

| | Peso molecular o masa atómica | Referencia |
|----------------------|-------------------------------|---------------------|
| PPAR α | 52,228 | Genbank NP_005027.2 |
| PPAR $\beta\delta$ | 49,904 | Genbank NP_006229 |
| PPAR γ | 57,623 | Genbank NP_056953 |
| RXR | 58,814 | Genbank NP_002948.1 |
| 6- ¹²⁵ IL | 428.1 | |
| 6-IL | 430 | |
| AA | 304.47 | |

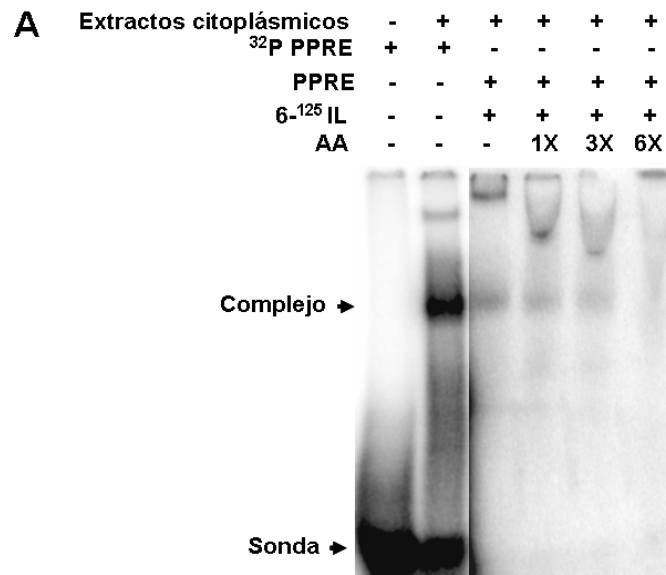
B

| | |
|--|------------------|
| PPAR α /RXR vs AA | 111042 vs 304.47 |
| PPAR γ /RXR vs 6-IL | 116437 vs 430 |
| PPAR γ /RXR vs 6- ¹²⁵ IL | 116437 vs 428.1 |

Tabla 8. Comparación de pesos moleculares de receptores y ligandos. A, Peso molecular de cada una de las isoformas de los PPARs, de 6-IL, 6-¹²⁵IL y AA. B, comparación de pesos moleculares de las posibles combinaciones para la formación de complejos PPAR-RXR/ligando.

Ensayos de competencia

Se realizaron ensayos de competencia para determinar la afinidad de la 6-IL por los PPARs. En la figura 5 se observa que al adicionar AA en concentraciones crecientes y usar la misma cantidad de 6-IL, se necesitan 6 veces más de AA para desplazar a la 6-IL. Este resultado sugiere que la 6-IL es más afin a los PPARs que el AA.



B

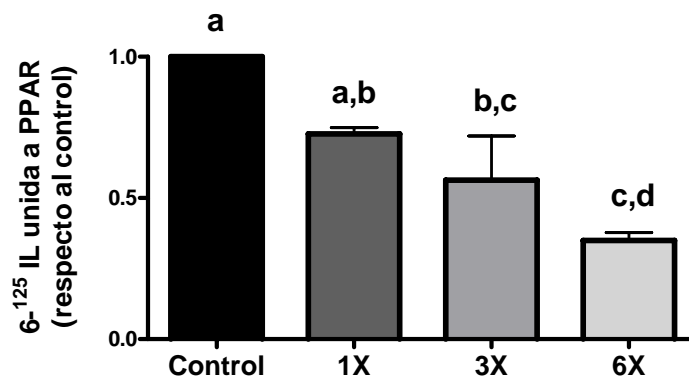


Figura 5. A, EMSA. Ensayo de competencia entre AA y 6-IL. Se sugiere que la 6-IL es 6 veces más afín a PPAR que AA. **B, Análisis densitométrico de A.** Diferentes superíndices representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Se realizaron una serie de controles para determinar que el complejo formado por PPRE/PPAR es específico. En la figura 6A se muestra una imagen representativa de un gel en el que se realizó la competencia entre el (wild type, wt) ^{32}P wtPPRE y el wtPPRE en cantidades crecientes. Se muestra que a mayor cantidad de wtPPRE desaparece el complejo. Lo anterior indica que el complejo formado es específico. En la figura 6B, se realizó la competencia entre el ^{32}P wtPPRE (wt) y un PPRE mutado (*mut*PPRE). Este *mut*PPRE corresponde a una variante del wtPPRE usado en los ensayos anteriores, con la diferencia de que para su diseño se intercambiaron dos de los nucleótidos que se ha reportado en la literatura son importantes para el reconocimiento de las proteínas PPAR. El resultado muestra que el *mut*PPRE no es capaz de desplazar al wtPPRE.



Figura 6. Competencia entre wtPPRE marcado vs wtPPRE no marcado. *A*, EMSA. Competencia entre wtPPRE marcado vs wtPPRE no marcado, en exceso molar. Se observa que a mayor concentración de PPRE no marcado disminuye el complejo. Lo que indica que es específico. *B*, Competencia entre wtPPRE marcado vs mutPPRE no marcado, en exceso molar. En presencia de concentraciones crecientes de mutPPRE, no se pierde el complejo. Indicando que es específico.

Ensayos de super-retardo

Para determinar cual de las tres isoformas de los PPAR están presentes en los complejos observados en los experimentos anteriores, se realizaron ensayos de super-retardo en los que se adicionaron anticuerpos contra cada una de las isoformas de los PPARs. Anti-PPAR alfa, anti-PPAR beta/delta y anti-PPAR gamma, así como un anticuerpo utilizado como control negativo, anti-IgG. La figura 7A muestra que cada uno de los anticuerpos de PPAR fueron capaces de desplazar el complejo formado por PPRE/PPAR, lo anterior es debido a que la presencia del anticuerpo interfiere con la unión PPRE/PPAR. Así mismo, en la figura 7B, se observa que cuando se adicionan los tres anticuerpos anti-PPAR juntos, el complejo se desaparece totalmente. En contraste con en carril en el que fue adicionado el anticuerpo anti-IgG en el que el complejo permanece. Estos resultados muestran que bajo estas condiciones, las tres isoformas de PPAR se encuentran en el complejo. La figura 7C y 7D muestran el análisis densitométrico, que corresponde a la figura 6A y 6B respectivamente.

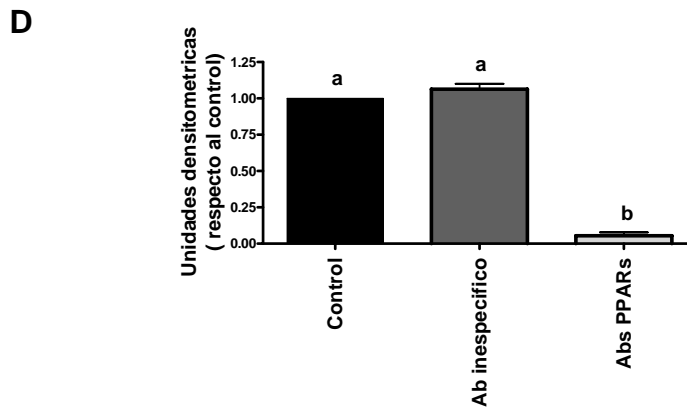
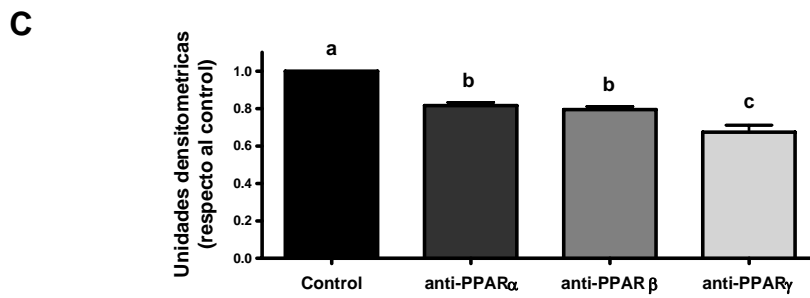
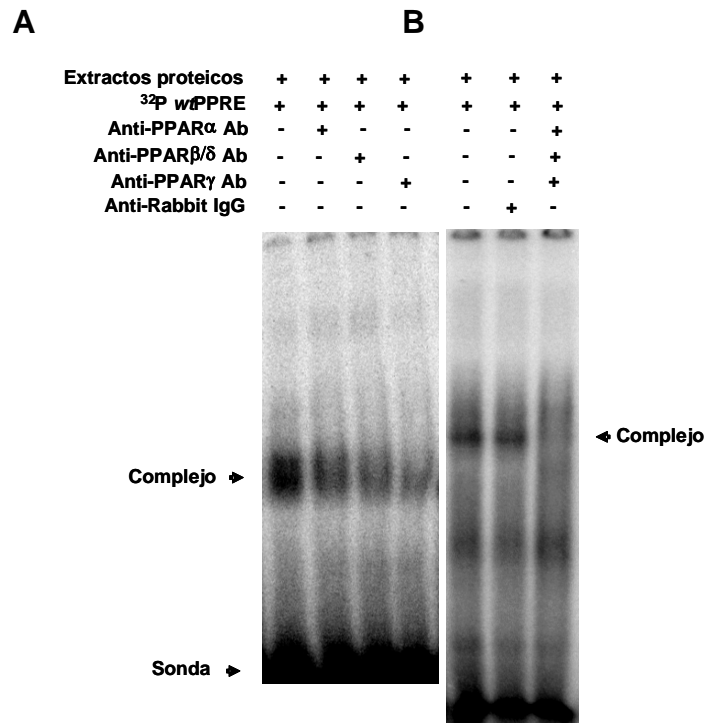


Figura 7. Ensayos de super-retardo. A, En presencia de los anticuerpos específicos de las tres isoformas de PPAR de manera independiente se evita la formación del complejo entre PPAR/RXR y PPRE. B, En presencia de los tres anticuerpos contra PPARs desaparece el complejo. Sugiriendo la presencia de las tres isoformas de PPAR en el mismo. C, Análisis densitométrico de A. D, Analisis densitometrico de B. Se observan diferencias significativas con respecto a los complejos en ausencia de anticuerpos.

RT-PCR tiempo real de PPARs

Para analizar si las células MCF-7 expresan las tres isoformas de los PPARs se realizó RT-PCR tiempo real para cada una de las isoformas. Lo anterior se realizó además comparando la expresión de los PPARs en una línea celular de epitelio mamario no tumoral MCF-12F y las células de cáncer mamario MCF-7 (figura 8). Los resultados muestran que las células tumorales (MCF-7) expresan en general más de las tres isoformas. De hecho, PPAR α no es detectable en las células no tumorales. Con respecto a la expresión de los PPAR en las células MCF-7 se observa que expresan más PPAR β/δ , seguido de PPAR γ y finalmente menor PPAR α . Estos datos concuerdan con lo encontrado en los ensayos de retardo en los que se identifico a las tres isoformas de PPAR en las células MCF-7.

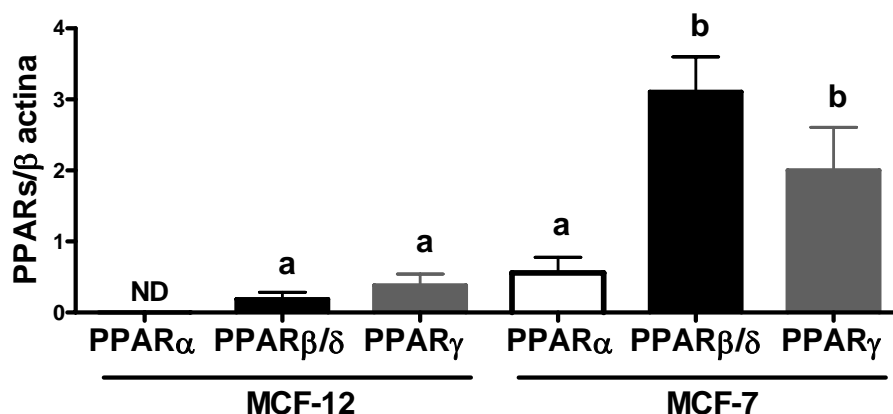


Figura 8. Análisis de la expresión basal de mRNAs de las tres isoformas de PPAR. Análisis de la expresión basal de mRNAs de las tres isoformas de PPAR en células de epitelio mamario humano de fenotipo normal (MCF-12F) y de células de epitelio mamario humano tumoral (MCF-7).

Transactivación del elemento de respuesta de PPARs (PPRE)

En los resultados mostrados anteriormente, vemos que la 6-IL es capaz de unirse a los PPARs. Por lo que en el segundo objetivo se planteó determinar si esta unión es funcional. A través de ensayos de transactivación se analizó la capacidad de activar al PPRE unido al gen reportero luciferasa (PPRE-TKLUC), transfectando a las células MCF-7 y adicionando 6-IL. Un control adicional fue utilizado, el cual corresponde al plásmido que no posee el PPRE (TK-LUC). Como controles de inducción se usaron el AA y la rosiglitazona (RZ), un ligando sintético específico para PPAR γ . La figura 9 muestra que se requiere 100 veces más cantidad de AA para activar al PPRE. Estos datos concuerdan con lo encontrados en los ensayos de competencia realizados en EMSAs, en los que se observó que la 6-IL es más afín a los PPARs comparada con el AA.

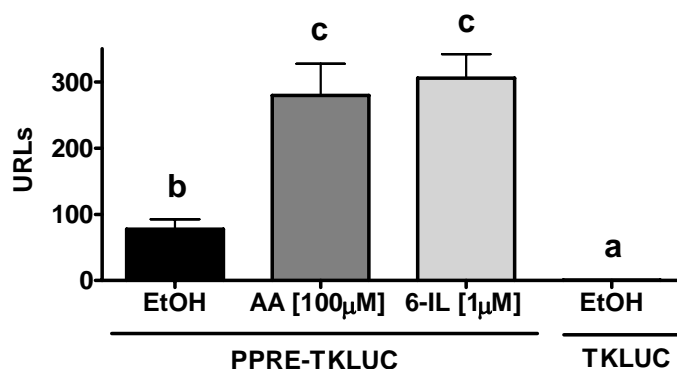


Figura 9. Ensayos de transactivación para 6-IL y AA. Células MCF-7 transfectadas con PPRE-TKLUC o con el plásmido que no contiene el PPRE. En presencia de AA y 6-IL se induce la actividad del gen reportero luciferasa, (URLs, unidades relativas de luz). Se requiere mayor cantidad de AA para inducir la actividad del gen reportero. Se observan diferencias significativas con respecto al vehículo.

Más aún, se realizaron ensayos de transactivación en las células MCF-7 utilizando como control positivo a la rosiglitazona (RZ) la cual es un ligando sintético específico de PPAR γ . La figura 10 muestra la activación del PPRE dosis-respuesta con RZ y con 6-IL. Este resultado indica que la RZ es 10 veces más potente que la 6-IL, pues desde 0.1 μ M ya se observan diferencias significativas comparadas con el control. Sin embargo, la activación observada por la adición de la 6-IL corresponde al rango de efectividad reportado para ligandos endógenos de los PPARs (Ver tabla 4).

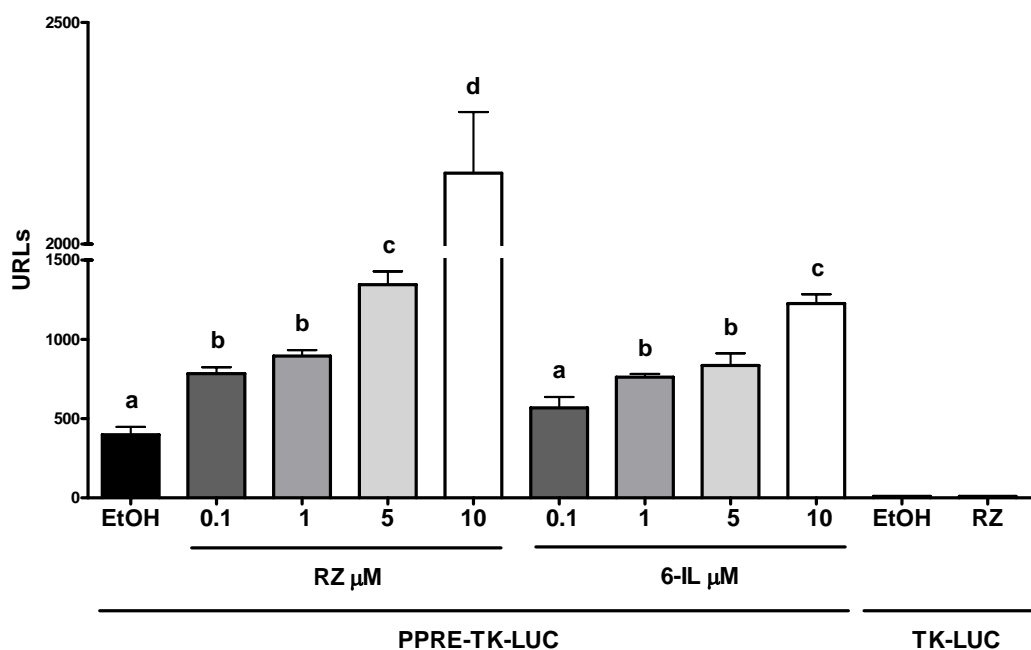


Figura 10. Ensayos de transactivación de 6-IL y Rosiglitazona. Células MCF-7 transfectadas con PPARE-TkLUC. En presencia de Rosiglitazona (RZ) y 6-IL se induce la actividad del gen reportero luciferasa, (URLs, unidades relativas de luz). Se observan diferencias significativas con respecto al vehículo.

RT-PCR tiempo real de PPARs en MCF-7 tratadas con 6-IL

Para el objetivo 3 nos interesó analizar si la 6-IL es capaz de activar y/o reprimir la expresión de las isoformas de los PPARs. Para ello se realizó RT-PCR tiempo real de cada una de las isoformas de PPAR. Las células MCF-7 fueron tratadas con etanol (vehículo de la 6-IL) ó con 6-IL. La figura 11 muestra que la 6-IL es capaz de disminuir la expresión de PPAR α , en contraste con el aumento en la expresión de PPAR γ y sin cambios de PPAR β/δ . Estos resultados indican que la 6-IL por un lado, reprime la expresión de la isoforma alfa, la cual ha sido asociada a proliferación celular. Además de que es un agonista de PPAR γ , el cual se sabe es un mediador de procesos antiproliferativos y apoptóticos. Para corroborar el aumento en la expresión de PPAR γ se realizó la inmunodetección de la proteína

PPAR γ (figura 12A). Así como el correspondiente análisis densitométrico mostrado en la (figura 12B). Estos resultados indican que la 6-IL modula la expresión de los PPARs y que es un agonista de PPAR γ .

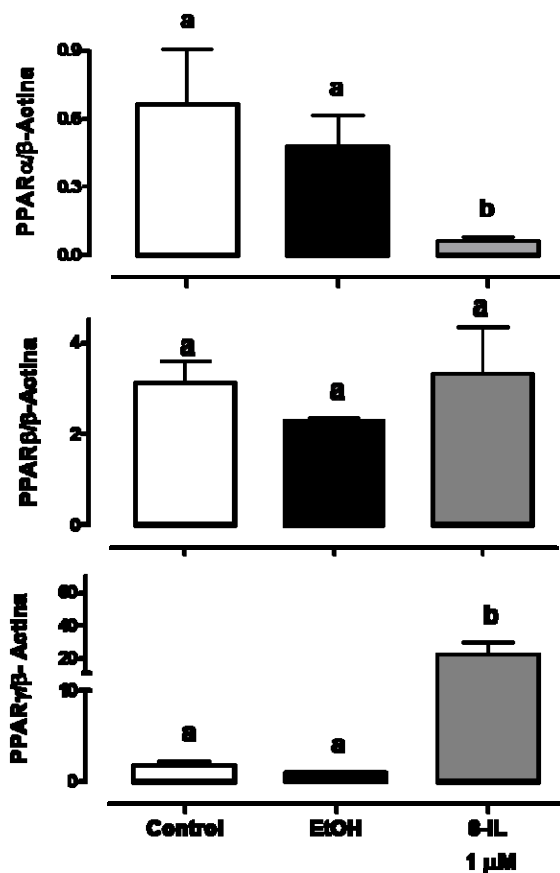


Figura 11. Análisis de la expresión de las isoformas de PPARs con 6-IL. Análisis de la expresión de mRNA de PPARs, en células MCF-7 tratadas con 6-IL. La 6-IL reprime la expresión de la isoforma alfa y activa la expresión de la isoforma gamma. No se observan cambios en la isoforma beta.

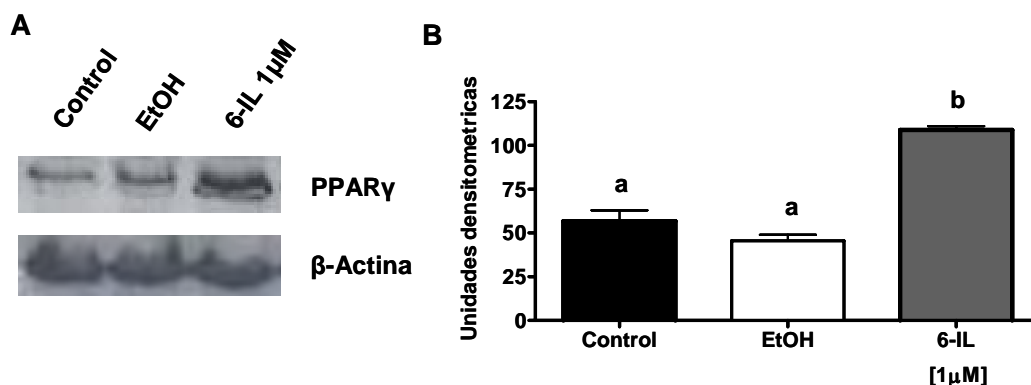


Figura 12. Análisis de la expresión de la proteína PPARγ. Análisis de la expresión de la proteína PPARγ, en células MCF-7 tratadas con 6-IL. *A*, en presencia de 6-IL aumenta la expresión de PPARγ. *B*, Análisis densitométrico de *A*.

Efecto fisiológico de la inducción de PPARγ

Finalmente y para cubrir el cuarto objetivo, se analizó el efecto de la 6-IL en la activación de PPARγ en un ensayo funcional. Dicho ensayo consiste en la identificación de lípidos neutros, esta respuesta es dependiente directamente de la activación de PPARγ. Las células MCF-7 fueron tratadas con etanol 0.1% (control), rosiglitazona 5 μM, AA 30μM y 6-IL 5μM durante 5 días, al sexto día fueron teñidas con rojo oleoso. El rojo oleoso tiñe de rojo a los lípidos neutros en aquellas células que acumularon lípidos en el citoplasma después del tratamiento. La figura 13 muestra que las células control no acumulan lípidos (figura 13A), mientras que el control positivo (RZ) induce la acumulación de lípidos (figura 13B), el AA no es capaz de tener el efecto del agonista de PPARγ (figura 13C), en cambio la 6-IL muestra una acumulación de lípidos equivalente a la que se indujo con RZ a la misma dosis. Estos datos muestran que en efecto la 6-IL es una agonista de PPARγ.

En la figura 13, en el panel superior se utilizó una magnificación en la imagen de 10X, mientras que el panel inferior se utilizó una magnificación de 40X.

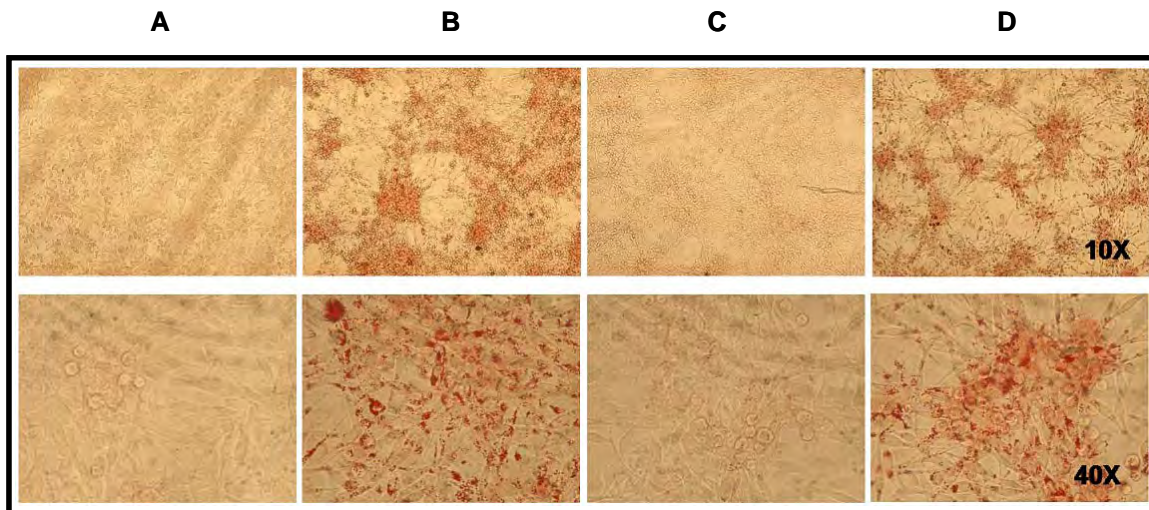


Figura 13. Efecto fisiológico de la inducción de PPAR γ . Células MCF-7 tratadas con por 5 días con A) 0.1 % de etanol (control), B) 5 μ M de rosiglitazona (RZ), C) 30 μ M de ácido araquidónico (AA), D) 5 μ M de 6-IL, el día 6 fueron fijadas con paraformaldehído al 2% por 20 minutos y teñidas con rojo O. La amplificación de las figuras del panel superior es 10 X y las del panel inferior 40 X.

DISCUSIÓN

Hasta hace pocos años los estudios sobre los PPARs habían estado enfocados a su participación en el metabolismo de lípidos (Desvergne et al., 1999; Berger y Moller, 2002). Recientemente se ha documentado que estos receptores también participan en la regulación de la proliferación celular en varios tipos de cáncer, incluyendo el de glandula mamaria (Michalik et al., 2004; Tachibana et al., 2008). Se ha sugerido que cada una de las isoformas conocidas: PPAR α (PPAR alfa), PPAR β/δ (PPAR beta/delta) y PPAR γ (PPAR gamma), participan de manera distinta en el proceso canceroso y que su activación depende principalmente del ligando y del estado fisiopatológico de la célula (Michalik et al., 2004; Kliewer et al., 1994; Yu et al., 1995). Se ha mostrado que en células de cáncer de mama la activación de las isoformas alfa y beta favorece la proliferación (Suchanek et al., 2002; Yin et al., 2005) mientras que la isoforma gamma está relacionada a la inducción de diferenciación y apoptosis (Badawi et al., 2004; Lapillonne et al., 2003; Yin et al., 2001; Yin et al., 2005).

Se sabe que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son los principales ligandos endógenos de los PPARs (Krey et al., 1997). En la búsqueda de agentes antitumorales, se han descrito una serie de ácidos grasos activadores de PPAR γ , con capacidad antiproliferativa: Interesantemente se describió que al incorporarles halógenos a su estructura se incrementa su afinidad a dicho receptor siendo el más afin el que se le adiciona yodo. (fenilacetato < fenilbutirato < p-cloro-fenilacetato < p-yodo-fenilbutirato), sugiriendo que también el tipo de halógeno es importante en la conformación del ácido graso para ser reconocido por el receptor (Samid et al., 2000). Estos datos concuerdan con nuestros hallazgos de que la 6-IL, un ácido graso yodado, se une a los PPARs con una afinidad seis veces mayor que el ácido araquidónico.

El segundo objetivo del trabajo era analizar si la unión de la 6-IL con los PPAR era funcional. Se diseñaron dos tipos de experimentos: el funcional y el fisiológico.

Para el funcional utilizamos la metodología de transactivación del elemento de respuesta incorporado al cultivo de MCF-7. En este caso nuestros datos mostraron que la 6-IL es capaz de activar al elemento de respuesta (PPRE) de los PPARs usando dosis significativamente menores [1 μ M] comparado con el AA [100 μ M], corroborando que la 6-IL es un ligando específico y con mayor afinidad que el AA.

Datos previos de nuestro laboratorio muestran que el I₂, pero no el yoduro o la tiroxina, es capaz de reducir la proliferación de células tumorales mamarias, tanto *in vivo* como *in vitro* (García-Solís et al., 2005; Arroyo-Helguera et al., 2006). Además hemos descrito que la suplementación de I₂ y no de yoduro a células tumorales MCF-7 genera lípidos yodados similares a la 6-IL y que este lípido yodado despliega, a concentraciones hasta 20 veces menores y en todas las células (normales o tumorales), los mismos efectos apoptóticos observados con I₂ en células tumorales (Arroyo-Helguera et al., 2008), sugiriendo que en el efecto antineoplásico del yodo es necesario la formación de 6-IL.

Como hemos mencionado previamente, el AA precursor de la 6-IL es también un factor asociado al cáncer. Efectivamente se ha descrito que algunos tipos de tumores, particularmente los de origen epitelial y responsivos a hormonas, presentan actividad anormalmente elevada de la sintasa de ácidos grasos (FAS) involucrada en la biosíntesis de fosfolípidos (como el AA), necesarios para la formación de nuevas membranas en células de rápida proliferación (Baron et al., 2004). Esta elevada actividad de FAS esta correlacionada con los siguientes hallazgos en células cancerosas: 1) mayor cantidad de AA (Aceves et al., 2009; Nava-Villalba et al., 2009), 2) elevada actividad de la fosfolipasa A que es la encargada de liberar al AA de la membrana celular (Hatala et al., 1993), 3) aumentada actividad de la enzima COX-2 que es la encargada de la formación de eicosanoides a partir del AA (Subbaramaiah., 2001) y 4) elevada producción de prostaglandinas (Rillema et al., 1978). El aumento en la cantidad de AA en células tumorales observado tanto en modelos animales como en células de cáncer

mamario humano en cultivo permite explicar el hallazgo de otros grupos y nosotros en relación a que las células tumorales son más sensibles a la muerte con el tratamiento con yodo que las normales (Arroyo-Helguera et al., 2006, Rösner et al., 2009).

En el segundo bloque de experimentos de este trabajo se analizó el efecto fisiológico de la 6-IL en células MCF-7 en cultivo. En primer lugar describimos la concentración basal y el efecto del lípido yodado sobre expresión de los PPARs y se observó que las células no tumorales MCF-12F expresan niveles menores de mRNA de PPAR β/δ y PPAR γ , y no detectables de PPAR α . En contraste las células tumorales MCF-7 expresan a niveles elevados los mRNAs de las tres isoformas. Con respecto al efecto de la suplementación de 6-IL a las células MCF-7 en cultivo, nuestros datos mostraron que disminuye la expresión del RNA mensajero de PPAR α , aumenta la expresión (mRNA y proteína) de PPAR γ y no tiene efecto sobre la expresión del mRNA de PPAR β/δ . Indicando que la 6-IL es capaz de regular la expresión de cuando menos estas dos isoformas. Como segundo experimento fisiológico se analizó el efecto de dosis moderadas la 6-IL de manera crónica (6 días) en la acumulación de lípidos neutros que se conoce es dependiente de la activación específica de PPAR γ (Tontonoz et al., 1994; Mueller et al., 1998).

La sobre-expresión y la unión de la 6-IL a PPAR γ permiten explicar el efecto antiproliferativo y apoptótico observado con la suplementación del I₂. Es decir, la incorporación del I₂ al AA, genera lípidos yodados de gran afinidad (6-IL) e induce la expresión diferencial de la isoforma apoptotica (PPAR γ), generando una potente señal antineoplásica en células cancerosas que contienen abundante AA. De hecho este dato concuerda con datos clínicos que muestran que la presencia de PPAR γ en tumores mamarios se asocia a tumores menos agresivos y se considera como buen pronóstico (Mueller et al., 1998).

Aunado a lo anterior y en relación al mecanismo celular se conoce que aunque el AA es capaz de transactivar a las isoformas PPAR alfa y beta (Forman et al., 1997), parece unirse preferentemente a la isoforma alfa (Desvergne y Wahli, 1999). En ensayos *in vitro* con las células tumorales, tanto AA como algunos de sus derivados favorecen la proliferación celular (Razanamahefa et al., 2000). Sin embargo, no se tienen datos que muestren que este aumento en la proliferación de células tumorales este directamente regulado por PPAR α o PPAR β/δ .

Al comparar la activación del PPRE con 6-IL respecto a Rosiglitazona (RZ) (el ligando sintético mas potente para PPAR γ), la 6-IL fué solamente 10 veces menor. Más aún, cuando se adicionó la 6-IL o la RZ a las células MCF-7 la respuesta de acumulación de lípidos fué dosis-equivalente sugiriendo que la sensibilidad de las MCF-7 *in vivo* a ambos compuestos es similar. Al revisar en la literatura la afinidad de los ligandos endógenos de PPAR γ tales como 15-HETE (ácido hidroxieicosatetraenoico), 13-HODE (hidroxi-9,11-octadecadienoico) ácido linoleico entre otros, encontramos que éstos tienen efecto en rangos micromolares, sugiriendo que la afinidad de la 6-IL puede considerarse dentro de los rangos fisiológicos (Bishop-Bailey y Wray, 2003).

Previamente a este trabajo, se había reportado que el efecto antineoplásico del yodo involucraba la activación de cuando menos dos vías celulares: la apoptótica dependiente de Bax/Bcl2-caspasas y la antioxidante disminuyendo la acción de radicales libres y activando la expresión de la enzima catalasa (García-Solís et al., 2005; Arroyo-Helguera et al., 2008; Shrivastaba et al., 2006; Alfaro-Hernández y Aceves, 2009) En ambas vías, genes clave como Bax y Bcl2 así como catalasa pueden estar regulados por receptores PPAR. Efectivamente se han descrito sitios responsivos en los genes de Bcl2 y catalasa (Butts et al., 2004; Girnun et al., 2002).

En relación a lo anterior, resultados en el presente estudio muestran que la suplementación de 6-IL se acompaña de una disminución significativa en la expresión de PPAR α la cual es inductora de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl2, así como de una sobreexpresión de la isoforma PPAR γ inductora de apoptosis (Bax) y de la expresión de la enzima antioxidante catalasa. Por lo tanto es factible proponer que la 6-IL este ejerciendo su efecto a través de la activación de PPAR γ (apoptosis y antioxidante) y por la represión de la isoforma alfa (disminución de la proliferación y disminución en la expresión de Bcl2).

Es este trabajo también se muestra que la 6-IL es capaz de inducir la acumulación de lípidos neutros (triacilglicéridos, entre otros), dependiente de la activación de PPAR γ . Se conoce que los ligandos de PPAR γ (por ejemplo: troglitazona y rosiglitazona) inducen la diferenciación celular, de hecho, PPAR γ es considerado el gen iniciador de la cascada de señalización para la conversión del preadipocito al adipocito (Wang et al., 2000; Tontonoz et al., 1994). En este sentido, las células de mama, son consideradas como células con capacidad adipogénica. En cultivos primarios de células de cancer mamario humano, el tratamiento con ligandos selectivos de PPAR γ se acompaña de la acumulación de lípidos, la reducción de la capacidad clonogénica, la reducción en la proliferación, además de la supresión de genes marcadores de malignidad, tales como muscina (Mueller et al., 1998). Nuestros resultados también muestran que la respuesta de adipogénesis es dosis equivalente entre la 6-IL y la RZ lo cual sugiere que la 6-IL es un ligando potente y específico. Este hallazgo contrasta con nuestro resultado in vitro (ensayo de tranfección) donde la 6-IL es 10 veces menos potente. Aunque no tenemos explicaciones funcionales al respecto, es posible que en el ambiente fisiológico la 6-IL permita la unión preferencial a coactivadores específicos que se conocen son moduladores de la respuesta estimulante y que se ha documentado varían su afinidad por los diferentes ligandos (Bishop-Bailey y Wray, 2003)

Finalmente y con un acercamiento *in silico*, analizamos si la expresión de PPAR γ observada por la presencia de 6-IL podría ser debida a una auto-regulación de esta isoforma (Nuñez-Anita et al., 2009). Se conoce que PPAR α por ejemplo, posee un PPRE en su promotor (Mandard et al., 2004). Utilizando análisis bioinformáticos del promotor de PPAR γ 2 humano (Fajas et al., 1997), encontramos que posee un posible sitio PPRE (Anexo III). Sin embargo, resta analizar si dicho PPRE es funcional.

En conclusión, proponemos que la 6-IL se une a PPAR, que la unión es funcional, más aún, que es a través de ésta vía la modulación diferencial de la expresión de PPAR α y PPAR γ y que la 6-IL es un agonista de PPAR γ , lo cual sugiere un papel biológico de estos receptores nucleares en el efecto antineoplásico del yodo en cáncer mamario.

CONCLUSIONES

- La 6-IL se une de manera específica a los PPARs.
- Se sugiere que la 6-IL es más afín (6 veces) que el ácido araquidónico.
- La 6-IL confiere activación transcripcional al PPRE a partir de 1 μ M.
- La 6-IL disminuye la expresión de la isoforma alfa, induce a la isoforma gamma y no modifica a la isoforma beta/ delta
- La 6-IL aumenta el metabolismo de lípidos neutros dependiente de PPAR γ

Proponemos que el binomio 6-IL/PPAR es uno de los mecanismos moleculares por los que el I₂ exhibe el efecto antiproliferativo y apoptótico en células de cáncer mamario.

REFERENCIAS

- Aceves C y Anguiano B. Comprehensive handbook of iodine: Nutritional, biochemical, pathological and therapeutic aspects. Academic Press. 2009; 26 : 249-257.
- Aceves C, Anguiano B, Delgado G. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2005; 189- 196.
- Aceves C, García-Solís P, Arroyo-Helguera O, Vega-Riveroll L, Delgado G, Anguiano B. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. Participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). Mol Cancer. 2009; 8: 33-36.
- Alfaro-Hernández y and Aceves C. The other face of iodine: a protective free radical?. In: Pro-oxidant reactions: Physiological and pathological implications. Díaz-Muñoz M (Edt). Pandalai. En prensa 2010
- Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA- binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. Nucl Acids Res. 1991; 19: 2499.
- Anguiano B, García-Solís P, Delgado G, Aceves C. Uptake and gene expression with antitumoral doses of iodine in thyroid and mammary gland: Evidence that chronic administration has no harmful effects. Thyroid. 2007; 17: 851-859.
- Aranda N, Arroyo-Helguera O, Delgado G, Aceves C, Anguiano B. Iodine reduces proliferation without affecting metabolism and functionality of human prostate cancer cells. 78th Annual meeting of American thyroid association. 2007, Abstract # 114. p S-81
- Arroyo-Helguera O, Delgado G, Anguiano B, Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. Endocrine Related-cancer. 2006; 13: 1147-1158.

- Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocrine-Related cancer*. 2008; 15: 1003-1101.
- Badawi A F, Eldeen M B, Liu Y, Ross EA, Badr M Z. Inhibition of rat mammary gland carcinogenesis by simultaneous targeting of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Cancer Res*. 2004. 64: 1181-1189.
- Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*. 2004; 91: 47-53
- Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPAR. *Annu. Rev. Med*. 2002; 409- 35.
- Bishop-Bailey D, Wray J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2003; 71: 1-22
- Bocca C, Bozzo F, Francisa S, Colombatto S, Miglietta A. Involvement of PPAR gamma and E-cadherin/beta –catenin pathway in the antiproliferative effect of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells. *Int J Cancer*. 2007; 121: 248-256.
- Boeynaems JM, Hubbard WC. Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by the rat thyroid. *J. Biol. Chem*. 1980; 255: 9001 – 9004.
- Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S, Gabriele S, Belmonte M, Middea E, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma activates p53 gene promoter binding to NF κ B sequence in human MCF-7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2006; 20: 3083-3092
- Butts B, Tran N, Briehl M. Identification of a functional peroxisome proliferators activated receptor response element in the 3'untranslated region of the human bcl-2 gene. *Int J Oncol* 2004; 24: 1305- 1310.
- Cann SA, Van Netter JP, Van Netter C. Hypothesis: Iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Contr*. 2000, 11: 121-127.

- Corey EJ, Niwa H, Falck J R. Selective epoxidation of eicosa- cis-5, 8, 11, 14 - tetraenoic (arachidonic) acid and eicosa-cis-8,11,14 -trienoic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 1979; 101: 1586-1587.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator- activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocrine Rev.* 1999, 20: 649- 688.
- Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson E, Park D, Asou H, et al. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1998; 95: 8806-8881.
- Eskin B.A. 1970. Iodine metabolism and breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sci.*1970; 32: 911-947.
- Eskin B.A, Grotkowski C.E, Connolly C.P, Ghent WR. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biological Trace Element Reseach.* 1995; 45: 9-19
- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre A, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 18779-18789.
- Fauti T., S. Müller- Brüsselbach, M. Kreuzer, M. Rieck, W. Meissner, U. Rapp, H. Schweer, R. Kömhoff, and R. Müller. Induction of PPAR β and prostacyclin (PGI $_2$) synthesis by Raf signaling: failure of PGI $_2$ to activate PPAR β . *FEBS. J.* 2006; 273: 170-179.
- Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 4312-4317.
- Foreman JE, Sharma AK, Amin S, Gonzales FJ, Peters JM. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) inhibits cell growth in a mouse mammary gland cancer cell line. *Cancer letters* 2010; 288: 219-225

- Forman B, Tontonoz P, Chen J, Brun R, Spiegelmen M, Evans R. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*. 1995; 83: 803-812.
- Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, et al. Seaweed prevents breast cancer? *Jpn. J. Cancer Res*. 2001; 92: 483-487.
- García-Solís P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guzmán RC, Nandi S, et al. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I_2) but not by iodide (I^-) treatment evidence that I_2 prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 236: 49-57.
- Ghent WR, Eskin BA, Low DA, Hill LP. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Can J Surg*. 1993; 36: 453-460.
- Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins MEC. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol. Endocrinol*. 2002; 16: 2793-2801.
- Girroir EE, Hollingshead HE, Billin AN, Willson TM, Robertson GP, Sharma AK, et al. Peroxisome proliferators-activated receptors- β/δ (PPAR β/δ) ligands inhibit growth of UACC903 and MCF-7 human cancer cell lines. *Toxicology* 2008; 243: 236-243
- Han S, Sidell N, Fisher PB, Roman J. Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor γ in human lung carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1911-1919
- Hatala MA, Rayburn J, Rose DP. Characterization of phospholipase A2 activity in MDA-MB-435 human breast cancer cells. *Cancer lett*. 1993, 72: 31-37.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AMC, Dannenberg A J. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-related Cancer* 2001; 8: 97-114.
- Isseman I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990; 6294: 645-650.

- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 2000; 405: 421-424.
- Kliewer S.A, Forman BM, Blumberg B, Ong E.S, Borgmeyer U, Mangelsdorf A, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, 94: 7355 -7359.
- Konaklieva M.I, Plotkin B.J. Lactones: Generic inhibitors of enzymes? *M. Rev. Med. Chem*. 2005; 5: 73-95.
- Krey G, Braissant O, L´Horset F, Perroud M, Parker M, Wahli W.1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptor by coactivator.dependent receptor ligand assay. *Mol endocrinol*. 1997; 11: 779-790.
- Langer R, Burzler C, Bechtner G. Gärtner R. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003; 111: 325-329.
- Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, Gold D, Moqueen T, Sutherland R.L, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by a novel ligand synthetic triterpenoid 2-Cyano-3, 12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2003; 63: 5926-5939.
- Lonard D, O'Malley B W. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell*. 2006; 125: 411-414
- Mandard S, Mller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61: 393-416
- Medina D. Breast cancer: the protective effect of pregnancy. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 380S-384S.
- Metha RG, Williamson E, Patel MK, Koeffler HP. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor γ , retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92: 418-423

- Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nature Rev.* 2004; 4: 61-70.
- Monteagudo E.S., Caro HN, Veleiro AS, Pisarev MA, Burton G. Synthesis and characterization of iodinated derivatives of arachidonic acid. *Anal. Asoc. Quim. Argent.* 1990; 31-36.
- Molecular station: <http://www.celldeath.de/apometh/emsa.html>
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin MJ, Zhang M, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Moll. Cell.* 1998; 1: 465-470.
- Mustafa A, Kruger WD. Suppression of tumor formation by a cyclooxygenase-2 inhibitor and a Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist in an in vivo mouse model of spontaneous breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 4935-4942
- Nava-Villalba M, Nuñez-Anita RE, Falcón-Alcántara A, López M, Delgado G, Aceves C Identification of 6-iodolactone in mammary gland cancer cells after iodine treatment. 100th Annual meeting of American Association for cancer Research. Denver, Colorado USA. 2009. Abstract # 2669
- Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostag other lipid mediat* 2009; 89: 34-42.
- Peters JM, Cattley RC, Gonzalez FJ. Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis.* 1997; 18: 2029-2033
- Patrick L. Iodine: Deficiency and therapeutic considerations. *Alternative Medicine Review.* 2008;13: 116127
- Pighetti GM, Novosad W, Nicholson C, Hitt DC, Hansens C, Hollingsworth A, et al. Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res.* 2001; 21: 825-830

- Pisarev M, Gärtner R. Autoregulatory actions of iodine. In: Braverman E, Utiger R, editors. *Werner and Ingbar's the Thyroid. A fundamental and clinical text.* Philadelphia: Lippincott-Williams. 2000; 85- 90.
- Razanamahefa L, Prouff S, Bardon S. Stimulatory effect of arachidonic acid on T-47D human breast cancer cell growth is associated with enhancement of cyclin D1 mRNA expression. *Nutr Cancer.* 2000; 38: 274-80.
- Rillema JA, Mulder JA. Arachidonic acid distribution in lipids of mammary glands and DMBA-induced tumors of rats. *Prostaglandins Med.* 1978; 1: 31-38.
- Roberts-Thomson SJ, Snyderwine EG. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in normal rat mammary gland and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine-induced mammary gland tumors from rats fed high and low fat diets. *Toxicol Lett.* 2000; 118: 79-86
- Rolland PH, Martin PM, Jacquemier J, Rolland AM, Toga M. Prostaglandins in human breast cancer: evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 1980; 64: 1061- 1070.
- Rösner H, Torremante P, Möller W, Gärtner R. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009; 117: 1-10
- Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T. In: *Molecular Cloning: A laboratory manual* (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory. 1989; P.1- 1.21, P. 3-16.32.
- Samid D, Wells M, Greene ME, Shen W, Palmer CN, Thibault A. Peroxisome proliferator –activated receptor γ as a novel target in cancer therapy: Binding and activation by aromatic fatty acid with clinical antitumoral activity. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 933-941.
- Sekiya M, Funahashi H, Tsukamura K, Imai T, Hayakawa A, Kiuchi T, Nakao A. Intracellular signalling in the induction of apoptosis in a human breast cancer cell line by water extract of mekabu. *Int J Clin Oncol.* 2005; 10: 122 – 126.

- Shen Q, Brown PH. Novel agents for the prevention of the breast cancer: Targeting transcription factors and signal transduction pathways. *J. Mammary Gland. Biol. Neo.* 2003; 8: 45-73.
- Shrivastaba A, Tiwari M, Sinha RA, Kumar A, Balapure AK, Virendra KB, et al. Molecular iodine induces caspase- independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving mitochondria- mediated pathway. *J Biol Chem.* 2006; 281: 19762-19771.
- Siso E. The molecular biology of mammalian arachidonic and metabolism. *Am J Physical.* 1991; 260-L 13-L28
- Smyth PP. The thyroid, iodine and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003a, 5: 235-238.
- Smyth PP. Role of iodine in antioxidant defence in thyroid and breast disease. *Biofactors.* 2003b, 19: 121- 30.
- Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, et al. Activation of peroxisome proliferators-activated receptor δ stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* 2004; 64: 3162-3170.
- Still W.C, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem.* 1978; 19: 2923-2925.
- Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12440-12448.
- Suchanek KM, May JF, Robinson JA, Lee WJ, Holman NA, Monteith GR, et al. Peroxisome proliferators- activated receptor α in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA MB-231. *Mol Carcinogenesis.* 2002; 34: 165-171.
- Suh N, Wang Y, Williamson C, Risingsong R, Gilmer T, Willson T, Sporn M. A new ligand for the peroxisome proliferator – activated receptor γ (PPAR γ) GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 1999; 59: 5671-5673.

- Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, Doi T. The role of PPARs in cancer. *PPAR Res.* 2008, Article I.D. 102737.
- Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao QH. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nature Med.* 2000; 6: 871-878.
- Terashita Y., H. Sasaki, N. Haruni, T. Nishiwaki, H. Ishiguro Y. Shibata, J. Kudo, S. Konishi, J. Kato, H. Koyama, M. Kimura, A. Sato, N. Shinoda, Y. Kuwabara, and Y. Fujii. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression is correlated with poor prognosis in patients with esophageal cancer. *Jpn. J. Clin Oncol.* 2002; 32: 238-43.
- Thrall KD, Bull RJ. Differences in the distribution of iodine and iodide in the Sprague –Dawley rat. *Fundam Appl toxicol.* 1990; 15: 75- 81.
- Tikoo K, Kumar P, Gupta J. Rosiglitazone synergizes anticancer activity of cisplatin and reduces its nephrotoxicity in 7, 12-dimethyl benzanthracene (DMBA) induced breast cancer rats. *BMC Cancer* 2009; 9: 107
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblast by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79:1147-1156
- Venturi S. Is a role for iodine in breast disease? *The Breast.* 2001; 379-82.
- Wang C, Pattabiraman N, Zhou JN, Fu M, Sakamaki T, Albanese C. Cyclin D1 repression of peroxisome proliferators-activated receptor γ expression and transactivation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 6159-6173.
- Wang Y, Porter WW, Suh N, Honda T, Gribble GW, Leesnitzer LM, et al. A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Endocrinol.* 2000; 14: 1550-1556.
- Willson T, Lambert M, Kliewer S. Peroxisome proliferators- activated receptor γ and metabolic disease. *Annu. Rev Biochem.* 2001; 70: 341-367.

- Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 274: 1999; 9116-9121.
- Yin F, S. Wakino, Z. Liu, S. Kim, W. Hsueh, A. Collins, A. Herle, R. Law. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochym Biophys Res Comm.* 2001; 286: 916-922.
- Yin Y, Russell RG, Dettin LE, Bai R, Wei Z, Kozikowski A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor δ and γ agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005; 65: 3950-3957.
- Yu K, Bayona W, Kallne CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, et al. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem.* 1995; 270: 23975-23983

Anexo I.

Participación de PPAR α y PPAR β/δ en cáncer mamario

PPAR alfa

PPAR α fue la primera de las tres isoformas en ser identificada en 1990, como blanco de un grupo de sustancias sintéticas conocidas como fibratos (Isseman y Green, 1990). Se ha relacionado a esta isoforma con la activación de genes que regulan el catabolismo de ácidos grasos, así como genes que modulan el ciclo celular.

Estos receptores adoptan su nombre debido a que son mediadores de la proliferación de peroxisomas en hepatocitos de rata. Los peroxisomas son organelos intracelulares que contienen oxidasas consumidoras de oxígeno que producen peróxido de hidrógeno permitiendo la oxidación de una gran variedad de substratos y cumplen una importante función en el metabolismo de lípidos ya que en ellos se inicia la alfa y beta-oxidación de los ácidos grasos. La proliferación de peroxisomas es inducida por una variedad de estímulos ambientales y nutricionales, y esta mediado por factores de transcripción específicos como los receptores a ácido retinoico tipo X (RXR) y los PPAR (Isseman y Green 1990; Berger y Moller, 2002).

A la fecha, la participación de estos receptores en la proliferación de células hepáticas resulta ambigüo. En ratas se ha mostrado que algunos ligandos de esta isoforma facilitan la proliferación a través del aumento de niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno, induciendo daño al DNA. Sin embargo, este efecto no se observan en humanos (Peters et al., 1997), Actualmente los fibratos se utilizan en la clínica para tratar padecimientos como dislipidemias, aterosclerosis y resistencia a la insulina aunque no se ha dilucidado si estos efectos estan mediados por esta isoforma. (Willson et al., 2001).

Referente a los ligandos endógenos, se ha mostrado que el ácido araquidónico es uno de los principales ligandos (Forman et al., 1997; Desvergne y Wahli, 1999). La suplementación de AA a células de cáncer de mama T-47D, induce su proliferación es asociada al aumento en la expresion de ciclina D1, (Razanamahefa et al.,

2000). En células MCF-7, se ha visto que la activación de PPAR α por ligandos sintéticos como el clofibrato aumenta la proliferación, solamente cuando las células se cultivan en medio de cultivo libre de suero y a baja confluencia (Suchanek et al., 2002).

En modelos animales se ha observado el efecto contrario, se ha reportado que el tratamiento con el agonista de PPAR α , Wy-14643 disminuye el tamaño y número de tumores generados con el cancerígeno DMBA (Pighetti et al., 2001).

PPAR α se expresa moderadamente en la glándula mamaria virgen y lactante, mientras que esta sobreexpresada en la glándula mamaria tumoral (Roberts-Thomson et al., 2000). Por lo anterior se ha propuesto la posibilidad que esta isoforma tenga un papel importante en la carcinogenesis mamaria.

PPAR beta/delta

PPAR β/δ fue identificado algunos años después del descubrimiento de PPAR α . PPAR β/δ se expresa principalmente colon, piel, cerebro y epitelio mamario. Se ha sugerido que este receptor podría jugar un papel en el metabolismo del colesterol, implantación del embrión, proliferación de preadipocitos y maduración epidermal.

Aunque existen pocos estudios en relación a su papel en el cáncer mamario. Se ha demostrado que la activación de PPAR β/δ con ligandos sintéticos no afecta la proliferación de células cancerosas bajo condiciones normales de cultivo. Sin embargo, cuando se cultivan en ausencia de suero y a baja confluencia se estimula la proliferación de líneas celulares sensibles a hormonas como MCF-7 y T47-D, pero no afecta la proliferación de células no responsivas a hormonas MDA-MB-231 (Stephen et al., 2004). Para esclarecer el efecto sobre la proliferación de los ligandos de PPAR β/δ se realizó la cuantificación de mRNA de esta isoforma, en relación con ANGPTLA un gen blanco conocido de PPAR β/δ , con la finalidad de verificar su funcionalidad en células MCF-7, posteriormente, se trataron las células con dos ligandos sintéticos de PPAR β/δ en presencia y ausencia de suero, el resultado fue una modesta inhibición de la proliferación, en la cual, la presencia o

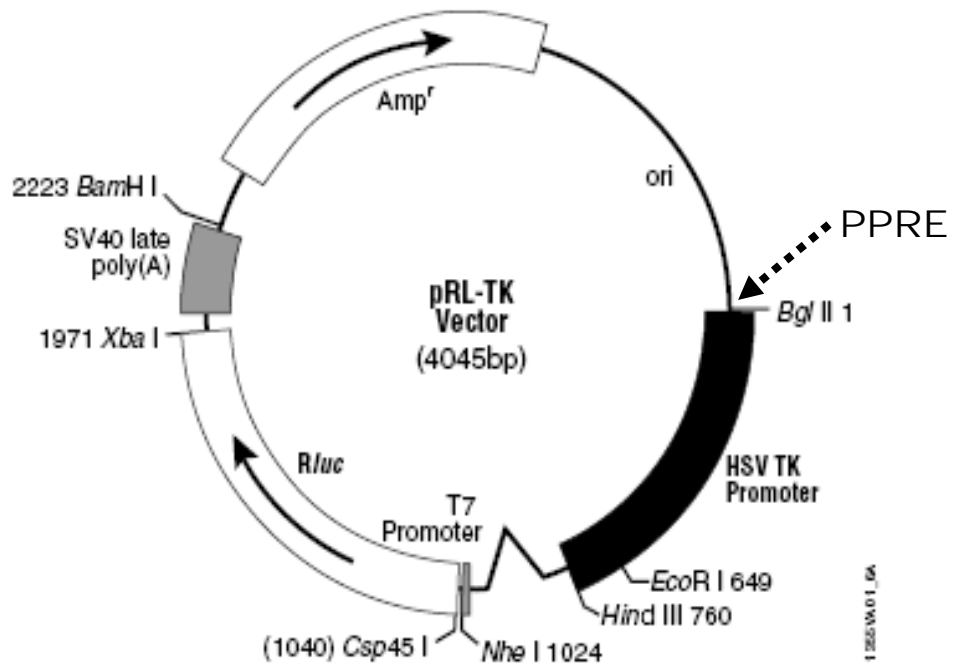
no de suero no parece influir en el efecto de la activación mediada por la presencia del ligando (Girroi et al, 2008). Coincidiendo con lo anterior, en células en cultivo de cancer mamario de ratonas MCF10A, el tratamiento con ligandos sintéticos GW072 o GW501516 produce una disminución tanto en la proliferación como en la expansion clonal, la cual se acompaña de inducción de apoptosis (Foreman et al., 2009)

En modelos *in vivo* también se ha analizado la participación de PPAR β/δ . En un modelo de cáncer mamario en ratonas tratadas con el cancerígeno DMBA, se observó que se acelera la formación de tumores cuando se les trata con el ligando sintético GW501516 (Yi et al., 2005). Dada esta diferencia en modelos *in vivo* e *in vitro*, es necesario realizar más experimentos que nos permitan esclarecer la función de PPAR β/δ en cáncer mamario

| PPAR alfa |
|--|
| Coactivadores |
| PPARBP, NCOA6, BFE, CREBBP, CITED2, NCOA1, NCOA3, SWI2/SNF2, PGC-1 α y PPARGC1B |
| Correpresores |
| NR1P1 y NCOR1 |
| PPAR beta/ delta |
| Coactivadores |
| NCOA1, NCOA3, NCOA6 y PGC-1 α |
| Correpresores |
| NCOR1 y NCOR2 |

Tabla 9. Proteínas coactivadoras y correpresoras de PPAR α y PPAR β/δ . (Datos obtenidos de Wilson et al., 2001).

Anexo II



Anexo III.

Núñez Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and Peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. Prostaglandins and other lipid mediators. 2009. 89: 34-42

Prostaglandins & other Lipid Mediators 89 (2009) 34–42



Contents lists available at ScienceDirect

Prostaglandins and Other Lipid Mediators



A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer

R.E. Núñez-Anita^a, O. Arroyo-Helguera^a, M. Cajero-Juárez^b, L. López-Bojorquez^a, C. Aceves^{a,*}

^aInstituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla Querétaro, Mexico
^bIAF-CMEB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 2 September 2008
 Received in revised form 16 February 2009
 Accepted 2 April 2009
 Available online 10 April 2009

Keywords:
 Iodine
 6-iodolactone
 Arachidonic acid
 PPAR
 EMSA
 Transfection
 Mammary cancer
 MCF-7

ABSTRACT

Recently we and other groups have shown that molecular iodine (I₂) exhibits potent antiproliferative and apoptotic effects in mammary cancer models. In the human breast cancer cell line MCF-7, I₂ treatment generates iodine-containing lipids similar to 6-iodo-5-hydroxy-eicosatrienoic acid and the 6-iodolactone (6-IL) derivative of arachidonic acid (AA), and it significantly decreases cellular proliferation and induces caspase-dependent apoptosis. Several studies have shown that AA is a natural ligand of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), which are nuclear transcription factors thought to participate in regulating cancer cell proliferation. Our results show that in MCF-7 cells: (1) 6-IL binds specifically and with high affinity to PPAR proteins (EMSA assays), (2) 6-IL activates both transfected (by transactivation assays) and endogenous (by lipid accumulation) peroxisome proliferator response elements, and (3) 6-IL supplementation increases PPAR γ and decreases PPAR α expression. These results implicate PPARs in a molecular mechanism by which I₂, through formation of 6-IL, inhibits the growth of human breast cancer cells.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Molecular iodine (I₂), but not potassium iodide (I⁻) or thyroid hormones (TH), exhibits potent antiproliferative and apoptotic effects in mammary cancer models both *in vivo* [1,2] and *in vitro* [3,4]. These effects may be mediated by the activation of a complex signaling cascade that includes p53, bax/bcl2, caspases, as well as the AIF-PARP-1 pathways [4,5]. Moreover, in the mammary tumor cell line MCF-7, administration of I₂ but not I⁻ is accompanied by iodination of proteins and lipids [3], suggesting that the antitumoral effects require an oxidized iodine species such as I₂ and the formation of iodinated components. These suggestions agree with reports showing that I⁻ could exert cytotoxic effects in several cell types only if iodide is oxidized by thyroperoxidase (TPO) [6,7]. In thyroid the apoptotic effect is mediated by at least two lipids: an iodinated arachidonic acid (AA) derivative known as 6-iodo-5-hydroxy-eicosatrienoic acid or 6-iodolactone (6-IL) and by 2-iodohexadecanal [8–10]. Our group showed that MCF-7 cells treated with I₂ generate iodolipids with a migration

similar to 6-IL, indicating that this iodolactone may also be produced after I₂ treatment of breast cancer cells [5]. Both I₂ and 6-IL activate the same signaling cascades, but 6-IL had an antiproliferative effect on MCF-7 cells that was 4-fold more potent than that of I₂ [3]. Polyunsaturated fatty acids such as eicosanoids and AA are natural ligands of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) [11,12], which belong to the nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcriptional factors. Transactivation of these receptors requires ligand binding, heterodimerization with retinoic X receptors (RXRs), and binding of this complex to a PPAR-specific response element (PPRE) in the promoter region of target genes [13,14]. Three PPAR isoforms have been identified PPAR α , PPAR β / δ and PPAR γ , and all of them have been detected in human mammary tumoral cell lines including MCF-7 [15]. In general, PPAR α is associated with the regulation of genes involved in proliferation [16,17], although some of its synthetic agonists can induce antiproliferation and apoptosis [18,19]. PPAR β / δ is expressed ubiquitously; its function in mammary cancer is uncertain, but it may enhance proliferation in certain sex hormone-sensitive cell lines such as breast and prostate [20,21]. PPAR γ , which is expressed primarily in adipose tissue, promotes adipocyte and mammary gland cell differentiation [22], and it has anti-tumorigenic effects in many cancer cell types including mammary gland [21,23–25]. Here we show that 6-IL binds and activates PPAR, and that it exerts opposite effects

^{*} Corresponding author at: Instituto de Neurobiología UNAM-Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla Querétaro, 76230, Mexico. Tel.: +52 442 2381067.
 E-mail address: caraev@servidor.unam.mx (C. Aceves).

1098-8823/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.04.001

on PPAR α and PPAR γ expression in MCF-7 cells. Together, these data support our hypothesis that the antiproliferative effect of I₂ is mediated by PPARs.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

MCF-7 human breast cancer cells were purchased from INCAN (Instituto Nacional de Cancerología, México). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were from Gibco BRL (Grand Island, NY). Arachidonic acid (purity > 99%) was from Calbiochem (La Jolla, CA). ¹²⁵I (17 Ci/mg) and γ ³²P-ATP (12.5 μ Ci/ μ l) were purchased from Perkin Elmer Life Science (Boston, MA), and oligonucleotides were from Sigma (St. Louis, MO). The polyclonal anti-PPAR α , anti-PPAR β/δ , and anti-PPAR γ antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). All other chemicals were of the highest grade of purity commercially available.

2.2. Cell culture

The human breast cancer cell line MCF-7 was cultured routinely in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, penicillin G (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.3. Chemical synthesis of ¹²⁵I-6-iodolactone (6-¹²⁵IL) and 6-IL

6-¹²⁵IL and 6-IL were synthesized and purified as described previously [3,26]. The purity was checked by thin layer chromatography on silica gel (TLC) using the solvent system CH₂Cl₂/MeOH (97.5:2.5). AA and 6-IL standards were visualized by iodine vapors, and the radiolabeled 6-¹²⁵IL was detected by autoradiography.

2.4. Protein extraction

Preparation of crude cytoplasmic and nuclear extracts was basically as described [27]. Briefly, adherent cells (10⁷ cells per well) were scraped into 1.5 ml of phosphate buffered saline (PBS). The cell suspension was transferred to a microfuge tube and centrifuged at 4 °C for 5 min at 500 \times g. The PBS was aspirated, and the cells were resuspended in 100 μ l buffer A (0.32 M sucrose; 10 mM Tris HCl, pH 8; 3 mM CaCl₂; 2 mM Mg(OAc)₂; 0.1 mM EDTA; 0.5% NP-40; 1 mM dithiothreitol; 0.5 mM PMSF). The cellular lysate was centrifuged at 4 °C for 5 min at 500 \times g, and the supernatant was transferred to a new tube (cytoplasmic fraction). The nuclear pellet was washed with 1 ml buffer B (buffer A without NP-40). The nuclei were centrifuged at 4 °C for 5 min at 500 \times g, and the supernatant was removed. The pellet was resuspended in 30 μ l buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 20 mM KCl; 0.2 mM EDTA; 25% glycerol; 0.5 mM DTT; 0.5 mM PMSF), and 30 μ l buffer D (20 mM HEPES, pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 1% NP-40; 0.5 mM DTT; 0.5 mM PMSF) was added. The samples were incubated at 4 °C for 45 min, then

centrifuged at 4 °C for 15 min at 14,000 \times g, and aliquots of the supernatant (nuclear extract) were stored at -70 °C. Protein was determined using the Bradford method (Bio-Rad protein assay; Hercules, CA).

2.5. Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs)

An established EMSA method was used [28]. Cytoplasmic or nuclear protein extracts (5–10 μ g) were incubated for 1 h at room temperature with 1 μ g poly(dI-dC) (Sigma), 6 μ l of buffer (25 mM HEPES, pH 7.9; 2 mM EDTA; 1 mM DTT; 0.1 M KCl, 0.5 mM PMSF), and 20 ng of a [³²P]-labeled oligonucleotide in a final volume of 20 μ l. AA, 6-IL, and 6-¹²⁵IL were added as indicated. For competition analysis, non-labeled wtPPRE at 25 \times , 50 \times , or 100 \times , or *mut*PPRE at 25 \times or 50 \times molar excess was added 15 min before ³²P-wtPPRE. DNA-protein or putative DNA-protein-ligand complexes were resolved at 120 V for 2–3 h in 0.5 \times TBE buffer on a native 6% polyacrylamide gel (5% for supershift), dried, and visualized using an intensifying screen and a Storm 860 phosphorimager scanner (Molecular Dynamics Inc., CA). For preparing ³²P-wtPPRE, both the sense and antisense oligonucleotides were labeled in a total volume of 20 μ l containing 20 ng of oligonucleotide, 0.5 μ l of T4 polynucleotide kinase (PNK), 2 μ l of 10 \times PNK reaction buffer and 1.5 μ l of gamma-³²P-ATP. A double-stranded oligonucleotide with the 3X-PPRE site was used (underlined) for shift assays and had the following sequence: wtPPRE (5'-GATCC-AGGGAAAAGGTCA TCAGGGAAAAGGTCAGTAGGGAAAAGGTCAC-3'); this PPRE has been identified in the human gene, muscle-type carnitine palmitoyltransferase MCPT1 [29]. As control, an oligonucleotide with a mutated 3X-PPRE site was used (mutated sites in boldface letters): sense *mut*PPRE (5'-AGTGAACAGGTCATCAGTGAACAGGTCACTAGTGAACAGGTC-3'). For the supershift assay, antibodies (1.2 μ g) were added to the reaction mixture, which was then incubated for 0.5 min at room temperature, and resolved in a native 5% polyacrylamide gel.

2.6. Gene transfer and transactivation experiments

Transient expression assays were performed with the established calcium phosphate precipitation method (Ca-PO₄) [30]. Briefly, MCF-7 cells were grown in six-well plates to a density of 2 \times 10⁵ cells/well in DMEM. One day later, the medium was changed, and cells were transfected by Ca-PO₄ with 6 μ g/well of the following plasmids: PPRE3-TK-LUC [containing 3 copies of PPRE coupled to a minimal thymidine kinase (TK) promoter], pTK-LUC, or pCMX- β gal (β -galactosidase) (Promega, Madison, WI). Cells were incubated in the presence of a mixture of plasmid and Ca-PO₄ for 7 h, washed, and incubated in the presence of different concentrations (0.1–10 μ M) of 6-IL, and rosiglitazone (RZ, a synthetic and specific PPAR γ agonist) as well as 30–100 μ M AA or vehicle alone (0.1% ethanol) for 24 h. Cell extracts were prepared and assayed for luciferase according to the manufacturer's instructions (Promega) and for β -galactosidase activity as described [31].

Table 1
Real-time PCR primer sequences.

| Sense/antisense (5' at 3') | Aliening temp (°C) | Reference |
|---|--------------------|---------------------------|
| PPAR α CATTTTIAAGTGTACACTGTGGTTTCC CAGCATTTCAGGAAAACGGTT | 62 | GenBank acc. 624622R10075 |
| PPAR β/δ GTCCGACAACGCTATCC CTCCGGGCTTCTTTTGGTCA | 62 | Reference no. [50] |
| PPAR γ TCTCTCCGTAATGGAAGACC GCATTATGAGACATCCCCAC | 62 | Reference no. [51] |
| β -Actin CCATCATGAAGTGTGACCTTG ACAGAGTACTTCCGCTCAGGA | 55 | Reference no. [32] |

2.7. Oil red staining

Cells were cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum, treated for 5 days in the presence of 5 μ M RZ, 30 μ M AA (the endogenous general PPAR ligand), 5 μ M 6-IL, or vehicle alone (0.1% ethanol), fixed on day 6 in 2% formaldehyde for 20 min, stained with oil red O [37] for 4 h, and photographed. All measurements were performed in triplicate.

2.8. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Cells were cultured at a density of 3×10^5 cells/well in 6-well plastic culture dishes (Nalge Nunc International, Naperville, IL) in

basal medium for 24 h; the medium was changed, and the cells were untreated or treated with 1 μ M 6-IL, or with vehicle for 24 h at 37 °C. After incubation, total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life technologies Inc.) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of total RNA was reverse transcribed using the Superscript II system (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR was performed on the sequence detector system Roto-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW) using SYBR green as a marker for DNA amplification. The reaction was performed with 1 μ l cDNA template and the qPCR supermix-UDG kit (Invitrogen), using 40 cycles of three-step amplification (94 °C for 30 s, 55–62 °C for 30 s, 72 °C for 30 s) and the gene-specific primers listed in Table 1. PCR generated only the expected specific amplicon, which was demonstrated



Fig. 1. Identification of 6-iodolactone (6-IL) and arachidonic acid (AA) by thin layer chromatography. Left panel: (A) 6-¹²⁵I-IL and AA were visualized using iodine vapors; (B) 6-¹²⁵I-IL was visualized using the Storm 860 phosphorimager scanner; (C) 6-IL and AA standards were visualized using iodine vapors. The samples contained 6 μ g of lipids. Right panel: chemical structures of 6-IL and AA.

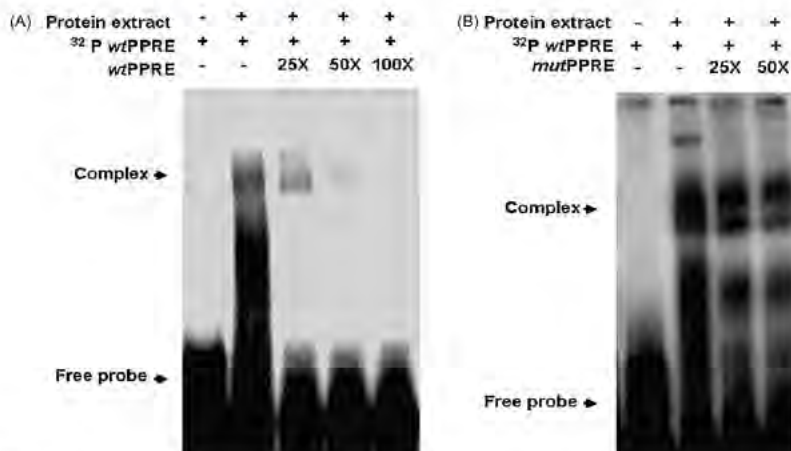


Fig. 2. Binding of the PPAR/RXR complex to normal (wtPPRE) or mutant (mutPPRE) responsive element of PPAR. Cytoplasmic extracts from MCF-7 cells (10 μ g protein) were incubated with ³²P- α -radiolabeled wtPPRE, either alone or in combination with: (A) 25-, 50-, or 100-fold molar excess of unlabeled wtPPRE and (B) 25- or 50-fold molar excess of unlabeled mutPPRE.

in each case by the melting temperature profile (dissociation curve) and by electrophoresis of 5 μ l of the PCR product through a 2% agarose gel containing ethidium bromide in TAE buffer. No PCR products were observed in the absence of template. Gene expression was calculated using the Dcycle threshold (Dct) method and normalized to the content of β -actin, a non-regulated housekeeping gene [32]. All measurements were performed in triplicate.

2.9. Western blot analysis

Whole cell extracts were obtained from MCF-7 treated for 24 h with 1 μ M 6-IL or vehicle. After treatment cells were washed once with ice-cold phosphate-buffered saline, then scraped and centrifuged. Pellets were lysed in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSE, 40 units/ml aprotinin, 15 μ g/ml leupeptin, 1% nonidet P-40, and 1% Triton X-100, pH 7.5). The extracted proteins were analyzed by Western blot. Protein content was determined using the Bradford method (Bio-Rad protein assay; Hercules, CA). SDS polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described [33], using resolving and stacking gels with 12 and 10% acrylamide, respectively. Samples containing 60 μ g protein were applied to each lane. After electrophoresis, the proteins were electrotransferred to a PVDF membrane, which was then blocked overnight with TBS containing 5% non-fat dry milk. The membranes were then rinsed and treated with polyclonal anti-PPAR γ antibody. Protein bands were visualized using a chemiluminescent detection system (ECL, Amersham Biosciences, UK). Membranes were stripped and reprobed with β -actin as a protein-loading control.

2.10. Bioinformatics search

Using 1.3 kb of the known 5'UTR of PPAR- γ (GenBank accession AF012874 for PPAR γ isoform 2, we searched for transcription factor binding sites (TFBS). Using the public version of TF Search [34–36] with the available vertebrate matrices and a threshold score up to 90.

2.11. Statistical analysis

The data were mean values of at least three different experiments and are expressed as mean \pm S.D. Differences between experimental groups were analyzed using a one-way ANOVA and Tukey's test; differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Identification of labeled (6-¹²⁵I), non-labeled 6-iodolactone (6-IL), and arachidonic acid (AA)

The 6-¹²⁵I was subjected to thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates. As shown in Fig. 1A, two spots were resolved by TLC; one corresponded to 6-IL and the second to the starting material, AA. This plate was exposed to an intensifying scanner screen (Storm 860 phosphorimager), and only the faster-moving spot, which corresponded to 6-¹²⁵I, was observed (Fig. 1B). To confirm the identity of these components, a non-labeled 6-IL synthesis sample was subjected to TLC on silica gel plates (Fig. 1C), and both spots (6-IL and AA) were detected. The right panel shows the chemical structures of 6-IL and AA.

3.2. Gel shift analysis of PPAR/RXR heterodimer binding to the PPAR response element (PPRE)

A double-stranded oligonucleotide probe for the wild-type sequence (wtPPRE) was end-labeled with ³²P (³²P-wtPPRE) and

incubated with cytoplasmic or nuclear extract from MCF-7 cells. Similar results were found with cytoplasmic and nuclear extracts, but since the band intensities were higher with the cytoplasmic extract, only these are shown (Fig. 2A). Cytoplasmic protein(s) bound to ³²P-wtPPRE (20 ng), and addition of increasing concentrations (25 \times , 50 \times , and 100 \times molar excess) of unlabeled PPRE reduced the radioactivity in the complex, suggesting that the binding is specific. In contrast, addition of a double-stranded oligonucleotide

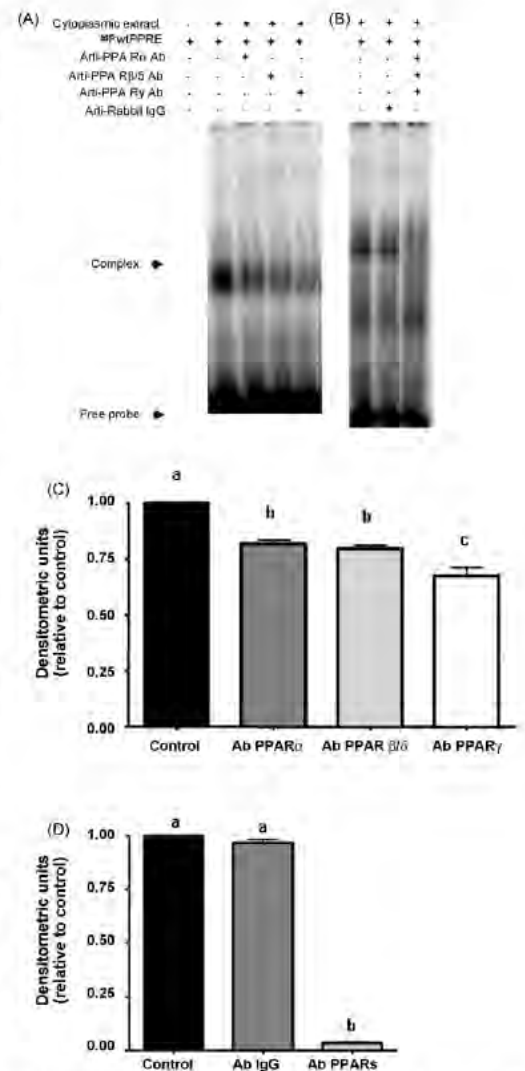


Fig. 3. Identification of PPAR isoforms. Cytoplasmic extracts from MCF-7 cells (10 μ g protein) were incubated with ³²P-radiolabeled wtPPRE and specific antibodies. (A and B) EMSA assay. (C and D) Densitometric analysis; as show in the figure: without antibody, anti-PPAR α , anti-PPAR β/δ , anti-PPAR γ , mix of all three PPAR antibodies or unspecific anti-rabbit IgG polyclonal antibody. The data are expressed as mean \pm S.D. (n=3). Different superscripts represent significant differences (p < 0.05).

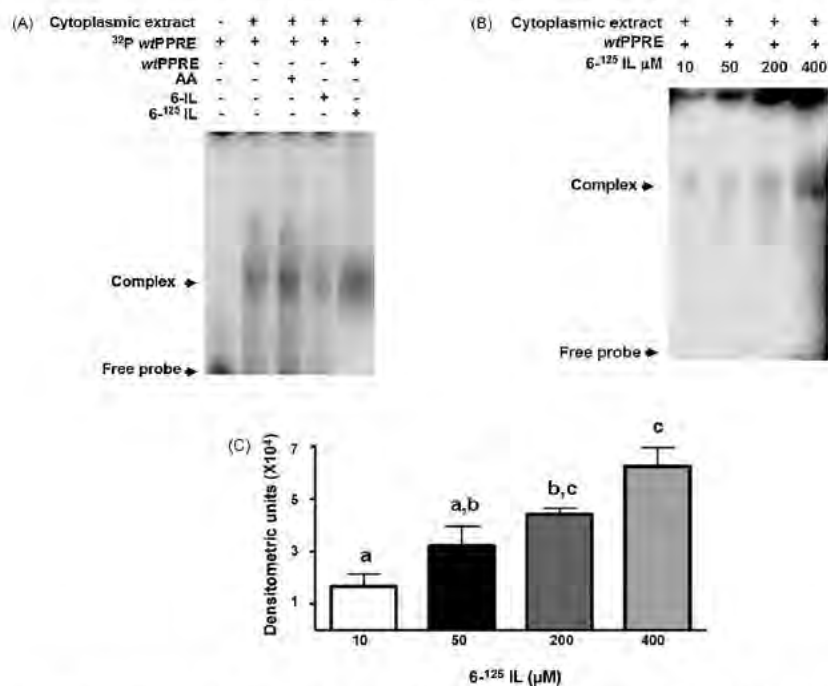


Fig. 4. 6-IL binds to the PPAR/RXR/wPPRE complex. Cytoplasmic extracts from MCF-7 cells (10 μg protein) were incubated with ³²P-radiolabeled wPPRE or non-radiolabeled wPPRE as indicated: (A) either alone or in combination with AA, 6-IL, or 6-¹²⁵IL; (B) with non-radiolabeled wPPRE and 10–400 μM 6-¹²⁵IL; (C) densitometric analysis. The data are expressed as mean ± S.D. (n = 3). Different superscripts represent significant differences (p < 0.05).

containing 2 base substitutions (mutant; *mut*PPRE at 25× and 50× molar excess) did not displace the ³²P-wPPRE from the complex (Fig. 2B). To confirm the presence of the different isoforms of PPAR receptors in the MCF-7 cells, cytoplasmic extracts were incubated with antibodies against PPARα, PPARβ/δ, or PPARγ (1.2 μg). Binding of protein to ³²P-wPPRE was attenuated in all cases. When added

together, the three antibodies blocked formation of the complex almost completely, whereas control antibody had no effect. These results confirm that MCF-7 cells contain all three PPAR isoforms (Fig. 3A and B), and indicate that each of them forms a complex with wPPRE. The bands were quantified, and the densitometric values are summarized in Fig. 3C and D.

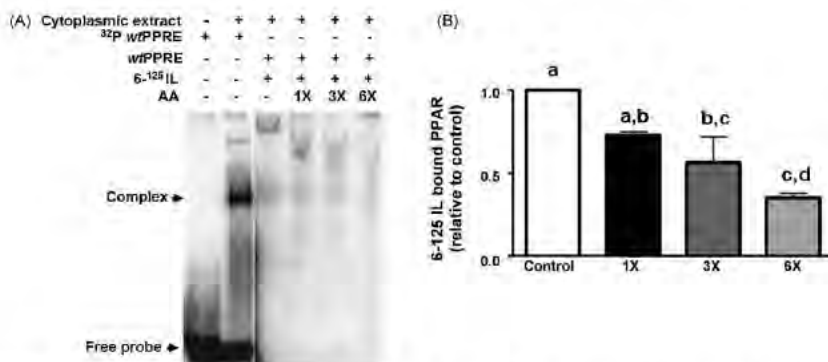


Fig. 5. Comparison of 6-IL with AA for binding to PPAR. (A) Cytoplasmic extracts from MCF-7 cells (10 μg protein) were incubated with ³²P-radiolabeled wPPRE or non-radiolabeled PPRE either alone or in combination with a constant concentration of 6-¹²⁵IL and increasing concentrations of AA. (B) Densitometric analysis. The data are expressed as mean ± S.D. (n = 3). Different superscripts represent significant differences (p < 0.05) (the control is complex without AA).

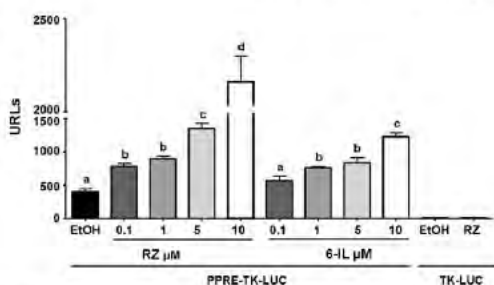


Fig. 6. Activation of PPRE. MCF-7 cells were transfected by Ca-PO₄ with PPRE3-TK-LUC or TK-LUC plasmids and incubated in the presence of different concentrations of 6-IL or RZ for 24 h. Normalized luciferase activity was determined as relative units of light (URLLs) compared to cells incubated with vehicle. The data are expressed as mean ± S.D. (n = 3). Different superscripts indicate significant differences (p < 0.05).

3.3. Gel shift analysis of PPAR binding to 6-IL

When ³²P-wtPPRE was incubated with crude cytoplasmic extracts, complexes of the same mobility were detected in the presence or absence of AA (20 μM) or 6-IL (10 μM). Due to their low molecular weights, binding of neither AA nor 6-IL can shift the mobility of the complex. To demonstrate the presence of 6-IL in the complex, non-labeled wtPPRE was incubated with cytoplasmic extracts and 6-¹²⁵I (20 μM). A radioactive complex (6-¹²⁵I/PPAR/RXR/PPRE) was detected with mobility identical to the complex between ³²P-wtPPRE and cytoplasmic protein (Fig. 4A). When increasing concentrations of 6-¹²⁵I were added, the radio-label that comigrated with the complex increased proportionally (Fig. 4B and C).

3.4. Affinity analysis of 6-IL for PPAR

Non-labeled wtPPRE was incubated with cytoplasmic extracts, 6-¹²⁵I (200 μM), and increasing concentrations of AA (1 ×, 3 ×, or 6 × molar excess). As shown in Fig. 5A, 6-IL is bound with high affinity to PPARs; a 6-fold molar excess of AA was necessary to displace 50% of 6-¹²⁵I (Fig. 5B).

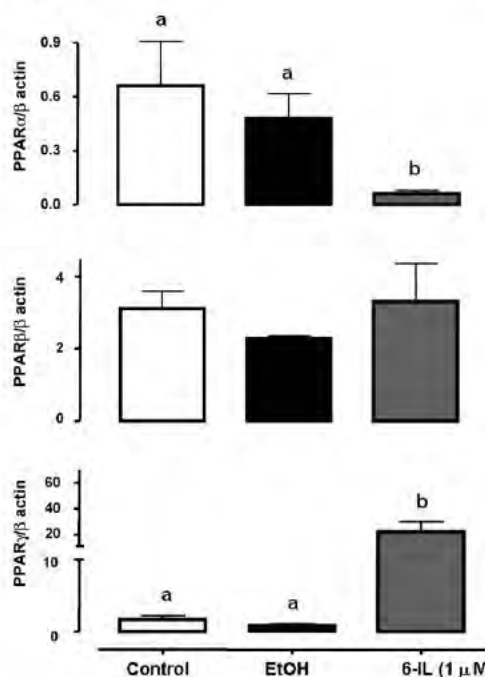


Fig. 8. Effect of 6-IL on expression of mRNA for PPAR. MCF-7 cells were treated with 1 μM 6-IL for 24 h. mRNA for PPAR was quantified using a real-time PCR method (oligonucleotides in Table 1). β-Actin served as internal control and was used to normalize for differences in input RNA. Different superscripts indicate significant differences (p < 0.05).

3.5. 6-IL activates PPRE

We examined the possibility that 6-IL activates transfected PPRE through endogenous receptors. MCF-7 cells were transfected with PPRE3-TK-LUC or TK-LUC plasmid. Fig. 6 shows that 6-IL activates

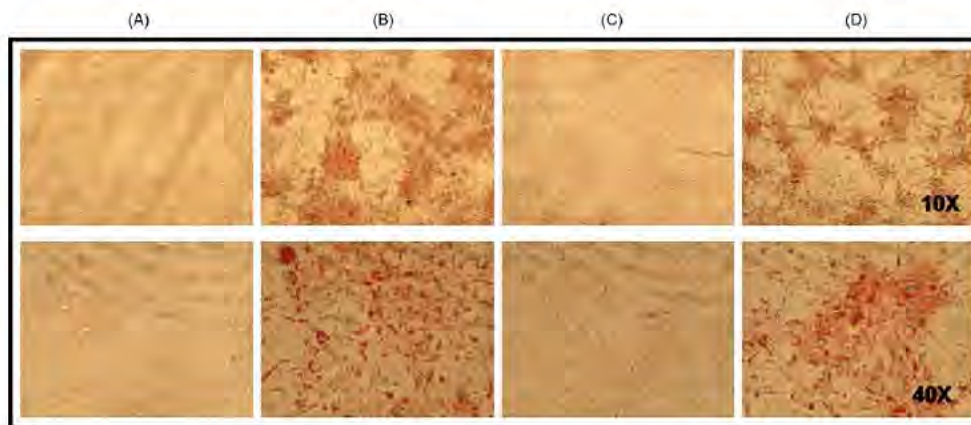


Fig. 7. Effect of PPARγ induction. MCF7 cells were treated for 5 days with 0.1% ethanol (A), 5 μM RZ (B), 30 μM AA (C), or 5 μM 6-IL (D), then fixed on day 6 in 2% formaldehyde for 20 min and stained with oil red O. For pictures in the upper panel, magnification is 10 ×; for those in the lower panel, magnification is 40 ×.

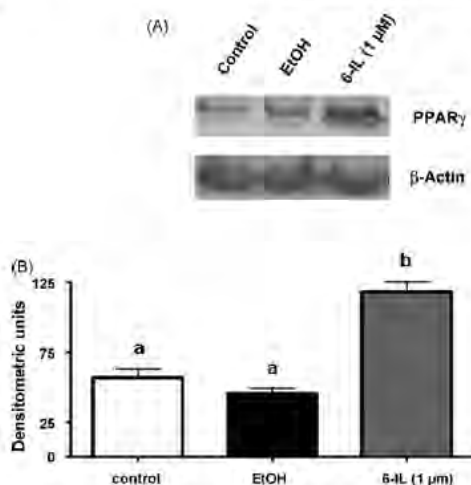


Fig. 9. Effect of 6-IL on protein PPAR γ expression. (A) Protein content of PPAR γ . MCF-7 cells were treated with 1 μ M 6-IL for 24 h. PPAR γ protein was analyzed by Western blot. β -Actin served as internal control. (B) densitometric analysis. The data are expressed as mean \pm S.D. (n = 3). Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$).

PPRE3X-TK-LUC in a dose-dependent manner, and its potency is 10-fold less than that of the synthetic ligand rosiglitazone (RZ). In addition, we tested the natural ligand AA, and 100 μ M AA was required for a PPRE-response equal to that obtained with 1 μ M 6-IL (data not shown).

3.6. PPAR γ activation

To analyze the activation of endogenous PPAR γ /PPRE, MCF-7 cells were treated with the general (AA) and specific (RZ) PPAR γ -agonists and with 6-IL. Fig. 7 shows that RZ or 6-IL induces a dramatic cellular morphological conversion, in which the cells round up and fill with red oil-stained lipids. In contrast, AA, which has low affinity for PPAR γ , generates a weak response.

3.7. Effect of 6-IL on PPAR expression

MCF-7 cells were treated with 1 μ M 6-IL, and the mRNA expression levels for the three PPAR isoforms were determined by quantitative real-time PCR and compared to those present in untreated control cells. Fig. 8, shows a significant decrease in PPAR α

and a significant increase in PPAR γ , without changes in PPAR β/δ mRNA levels. To corroborate the modulation of 6-IL in these isoforms of PPAR we performed a Western blot analyzes. Fig. 9 shows a significant increase of PPAR γ protein expression. PPAR α was undetectable in both control and 6-IL treated cells which agreed with low concentration of this isoform founded in RNA expression (data not shown).

3.8. Bioinformatics search

A search for transcription factor binding sites was performed for the proximal promoter of PPAR γ 2 previously reported [34]. Several protein binding sites were found (Fig. 10). The most interesting for us was a site for PPAR and a site for transcription factor, called thyroid transcription factor 1 (TTF-1), which is related to the expression of the Na/I symporter (NIS).

4. Discussion

Growing evidence implicates PPARs in the regulation of cell proliferation in various tissues including mammary gland [38]. Activation of PPAR α or PPAR β/δ induces primarily cell proliferation, whereas PPAR γ is more related to antiproliferation and apoptosis. The search for components that decrease the growth or cellular dedifferentiation characteristics of cancer has led to the identification of aromatic and halogenated fatty acids as promising new classes of antitumoral agents [11,39]. For analogues of phenylacetate, there is a positive correlation between their affinity for PPAR γ and their potency as antitumoral agents (phenylacetate < phenylbutyrate < p-chloro-phenylacetate < p-iodo-phenylbutyrate) [39]. Our results show that 6-IL, an iodinated aromatic fatty acid, binds to PPAR with high affinity (about 6-fold lower concentrations than AA), and induces and activates specifically the PPAR γ isoform. These data reinforce our earlier proposal that 6-IL/PPAR γ could participate in the antiproliferative and apoptotic effect of I $_2$ supplements. Data generated previously in our laboratory have shown that cancerous (MNU-induced mammary cancer and MCF-7 cells) but not normal mammary epithelial cells are capable of generating iodolipids like 6-IL and inducing apoptosis when given supplements of I $_2$, but not KI or T4 (2, 3, 5). In thyroid, 6-IL reduces cell proliferation even in the presence of methimazole, which inhibits thyroid peroxidase (TPO)-dependent iodide organification, showing that the effect of 6-IL is direct and is not dependent on intracellular formation of other iodocompounds [8,40].

Previous reports demonstrated that AA, which is a ligand of PPAR α , induces proliferation in cultured breast cancer cells [41]. Moreover, several studies have reported elevated prostaglandin levels in breast cancer, but not in normal mammary gland [42–44]. Prostaglandins are produced from AA by the enzyme cyclooxygenase-

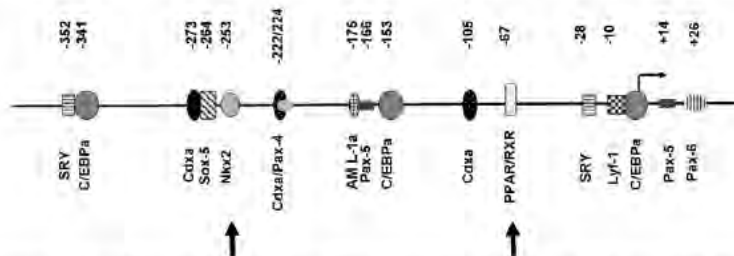


Fig. 10. Transcription factor binding sites (TFBS) in the 5'UTR of the human PPAR γ 2. Schematic representation of the 1.3 kb region of the PPAR γ 2 promoter showing the location of putative TFBS. Numbers indicate the starting nucleotide of the element upstream of the transcription start sequence. Bold arrows indicate the position of the putative PPAR/RXR and Nkx2 binding sites.

nase, suggesting the presence of high levels of AA in breast tumors [42]. Recently we showed that MNU-induced tumors contain 4-fold more AA than normal mammary glands, and that I₂ supplementation results in a 14-fold higher 6-IL content in these tumors [45]. It is possible that these high levels of AA, and the 6-IL formed from it, may explain why the antiproliferative effect of I₂ supplementation occurs only in tumoral cells [5].

In mammary cancer cells the activation of PPAR γ by the synthetic ligand troglitazone was correlated with neutral lipid accumulation, cessation of cell growth, and changes that are characteristic of a less malignant state [22]. We show here that both RZ and 6-IL could activate both the transfected (transactivation) and the endogenous PPARE. In the assays with transfected PPARE, RZ was 10 times more potent than 6-IL; however, in the assays with endogenous PPARE, the responses (lipid accumulation) of the two activators were similar. One possible explanation of this discrepancy is the rapid increase in PPAR γ expression (mRNA and protein) observed within the first 24 h of 6-IL treatment. These data and our finding that the proximal promoter of PPAR γ 2 contains a putative PPARE site, lead us to suggest that the gene for this PPAR isoform could be upregulated by the 6-IL/PPAR γ complex. Moreover, recent data have shown the existence of positive and/or negative crosstalk effects between PPAR isoforms [46]. Our data showed a significant decrease in the PPAR α isoform after 6-IL treatment. The mechanism responsible for this decrease is not known, but two possibilities could be explored: (1) that 6-IL acts indirectly to accelerate PPAR α turnover, or (2) that 6-IL/PPAR γ acts as a repressor at the previously described PPARE site present within the PPAR α gene [47].

Finally, we showed that the PPAR γ 2 promoter also has a site for NKX2.1. This protein, also called thyroid-specific transcription factor 1 (TTF-1), is related to thyroid differentiation and is a crucial component in the transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter (NIS) in thyroid and mammary gland [48]. The NIS gene also contains a PPARE site in its promoter region [49]. Recently, our group demonstrated that chronic I₂ treatment induces the re-expression of NIS, pendrin (PEN), and lactoperoxidase (LPO) in MNU-induced tumors [32], suggesting that I₂ action involves, in addition to the acute antitumoral effect, the induction of mechanisms associated with the uptake and oxidation of I⁻.

In summary, we show here that 6-IL binds PPARs with high affinity and that the 6-IL/PPAR γ complex differentially modulates expression of PPAR γ and PPAR α , suggesting a biological role of these nuclear receptors in the antineoplastic effect of I₂.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Ronald Evans for the PPARE3-TK-LUC expression plasmid and to Dr. Guillermo Juvenal for iodolactone synthesis advice. We also thank Felipe Ortiz and Guadalupe Delgado for technical assistance, Pilar Galarza and Rafael Silva for bibliographic assistance, Leonor Casanova for academic support, Nydia Hernández, Leopoldo Gonzalez, and Lourdes Lara for image advice, and Alberto Lara and Omar González for computer assistance, and Dr. Dorothy Pless and Dr. Michael C Jeziorski for proofreading. Rosa Elvira Nuñez-Anita was a graduate student of UNAM, Doctorate in Biomedical Science Program and received a fellowship from CONACYT 203107. This work was partially supported by grants: PAPIIT-UNAM 201207 and CONACYT 78955. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

[1] Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, et al. Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *J Surg Oncol* 1996;61:209–13.
 [2] García-Solis P, Alfaro Y, Anguiano B, et al. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide

(I⁻) treatment evidence that I₂ prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocrinol* 2005;236:49–57.
 [3] Arroyo-Helguera O, Delgado G, Anguiano B, Aceves C. Uptake and anti proliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1147–58.
 [4] Shrivastava A, Tiwari M, Sinha RA, et al. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving mitochondria-mediated pathway. *J Biol Chem* 2006;281:19762–71.
 [5] Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:1003–11.
 [6] Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, et al. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* 2000;141:598–605.
 [7] Zhang L, Sharma S, Zhu LX, et al. Nonradioactive iodide effectively induces apoptosis in genetically modified lung cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:5065–72.
 [8] Pisarev MA, Gartner R. Autorregulatory actions of iodine. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid. The fundamental and clinical text*. 8th ed. NY: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 85–90.
 [9] Pisarev MA, Krawiec L, Juvenal GJ, et al. Studies on the goiter inhibiting action of iodolactones. *Eur J Pharmacol* 1994;258:33–7.
 [10] Langer R, Buzler C, Bechtner G, Gartner R. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003;111:325–9.
 [11] Krey G, Braissant O, L'Horsset O, et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997;11:779–90.
 [12] Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4312–7.
 [13] Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPAR. *Annu Rev Med* 2002;53:409–35.
 [14] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649–88.
 [15] Suchanek KM, May FJ, Robinson JA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA MB-231. *Mol Carcinog* 2002;34:165–71.
 [16] Pighetti GM, Novosad V, Nicholson C, et al. Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res* 2001;21:825–30.
 [17] Miller RT, Glover SE, Stewart WS, Corton JC, Popp JA, Cattley RC. Effect on the expression of *c-met*, *c-myc* and PPAR- α in liver and liver tumors from rats chronically exposed to the hepatocarcinogenic peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 1996;17:1337–41.
 [18] Peters JM, Cattley RC, Gonzales FJ. Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 1997;18:2029–33.
 [19] Roberts RA, James NH, Woodyatt NJ, Macdonald N, Tugwood JD. Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha). *Carcinogenesis* 1998;19:43–8.
 [20] Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 2004;64:3162–70.
 [21] Yin Y, Russell RC, Dettin LE, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor δ and γ agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 2005;65:3950–7.
 [22] Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol Cell* 1998;1:465–70.
 [23] Elstner E, Müller C, Koshizuka K, et al. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8806–11.
 [24] Yin F, Wakino S, Liu Z, et al. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *BBRC* 2001;286:916–22.
 [25] Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleane-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:5926–39.
 [26] Dugrillon A, Uedelhoven WM, Pisarev MA, Betschner G, Gartner R. Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Horm Metab Res* 1994;26:465–9.
 [27] Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucl Acids Res* 1991;19:2499–503.
 [28] Molecular station <http://www.celldeath.de/apometh/ems.html>.
 [29] Girmun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins MEC. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol* 2002;16:2793–801.
 [30] Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T. *Molecular cloning in: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. p. 3–16,32.
 [31] Umeson K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 1991;65:1255–66.
 [32] Anguiano B, García-Solis P, Delgado G, Aceves C. Uptake and gene expression with antitumoral doses of iodine in thyroid and mammary gland:

- evidence that chronic administration has no harmful effects, *Thyroid* 2007;17: 851–9.
- [33] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [34] Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 1997;272:18779–89.
- [35] Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, et al. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucl Acids Res* 1998;26:364–70.
- [36] <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>.
- [37] Greene, Kehinde O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1974;1:113–6.
- [38] Michalik L, Desvergne B, Whali W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev* 2004;4:61–70.
- [39] Samid D, Wells M, Greene ME, Shen W, Palmer CN, Thibault A. Peroxisome proliferator-activated receptor γ as a novel target in cancer therapy: binding and activation by aromatic fatty acid with clinical antitumoral activity. *Clin Cancer Res* 2000;6:933–41.
- [40] Pisarev MA, Kleiman de Pisarev DL. Biochemistry of thyroid regulation under normal and abnormal conditions. *J Endocrinol Invest* 1980;3:317–28.
- [41] Razanamahefa L, Prouff S, Bardon S. Stimulatory effect of arachidonic acid on T-47D human breast cancer cell growth is associated with enhancement of cyclin D1 mRNA expression. *Nutr Cancer* 2000;38:274–80.
- [42] Bennett A, Charlier EM, McDonald AM, Simpson JS, Stamford IF, Zebro T. Prostaglandins and breast cancer. *Lancet* 1977;24:219–25.
- [43] Rolland PH, Martin PM, Jacquemier J, Rolland AM, Toga M. Prostaglandins in human breast cancer: evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J Nat Cancer Inst* 1980;64:1061–70.
- [44] Tan WC, Privett OS, Goldyne ME. Studies of prostaglandins in rat mammary tumors induced by 7,12-dimethyl-benzanthracene. *Cancer Res* 1974;34:3229–31.
- [45] Aceves C, García-Solis P, Arroyo-Helguera O, et al. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. Participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Molecular Cancer*, 2009, in press.
- [46] Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:393–416.
- [47] Pineda-Torra I, Jamshidi Y, Flavell DM, Fruchart JC, Staels B. Characterization of the human PPAR α promoter: identification of functional nuclear receptor response element. *Mol Endocrinol* 2002;16:1013–28.
- [48] Fregman H, Andersson L, Nilsson M. The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev Dyn* 2006;235:444–55.
- [49] Dentice M, Luongo C, Elefante A, et al. Transcription factor Nkx-2.5 induces sodium/iodide symporter gene expression and participates in retinoic acid- and lactation-induced transcription in mammary cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:7863–78.
- [50] Fauti T, Müller-Brüsselbach S, Kreutzer M, et al. Induction of PPAR β and prostacyclin (PGI $_2$) synthesis by Raf signaling: failure of PGI $_2$ to activate PPAR β . *FEBS J* 2006;273:170–9.
- [51] Terashita Y, Sasaki H, Haruni N, et al. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression is correlated with poor prognosis in patients with esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:238–43.

Anexo IV

Nuñez-Anita R.E, Cajero-Juárez M, and Aceves C Peroxisome proliferator-activated receptors. Role of isoform gamma in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. 2010. Enviado a *Current Cancer Drug Targets*

PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS. ROLE OF ISOFORM GAMMA IN THE ANTINEOPLASIC EFFECT OF IODINE IN MAMMARY CANCER.

Nuñez-Anita R.E,* Cajero-Juárez M, ‡ and Aceves C.

Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla, Querétaro and ‡Laboratorio de Biotecnología Animal, IIAF-CMEB-UMSNH, Morelia, Michoacán. México.

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are ligand-activated transcription factors. Three subtypes -- PPAR alpha, PPAR beta, and PPAR gamma -- have been identified and are differentially expressed in tissues. Originally, they were described as molecular regulators of lipid metabolism; recently, it has been shown that they are also involved in regulating the cell cycle and apoptosis in both normal and tumoral cells. In fact, some synthetic PPAR ligands are used to treat dyslipidemia, metabolic diseases, and type 2 diabetes. Here, we review the role of PPAR gamma (PPAR γ) in tumor initiation and progression, emphasizing the relationship between this isoform and the cellular and molecular mechanisms involved in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer.

Anexo V

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. La familia de receptores nucleares PPARs. | 15 |
| Figura 2. Mecanismo molecular de PPARs. | 18 |
| Figura 3. Cromatografía en capa fina para identificar a la 6-IL y AA | 38 |
| Figura 4. EMSA para determinar la unión de la 6-IL a los PPARs | 40 |
| Figura 5. EMSA. Ensayo de competencia entre AA y 6-IL | 42 |
| Figura 6. EMSA. Competencia entre wtPPRE vs wtPPRE | 44 |
| Figura 7. Ensayos de super-retardo | 46 |
| Figura 8. Expresión basal de mRNAs de las tres isoformas de PPAR | 48 |
| Figura 9. Ensayos de transactivación para 6-IL y AA | 49 |
| Figura 10. Ensayos de transactivación de 6-IL y Rosiglitazona | 50 |
| Figura 11. Análisis de la expresión de las isoformas de PPARs con 6-IL | 51 |
| Figura 12. Análisis de la expresión de la proteína PPAR γ | 52 |
| Figura 13. Efecto fisiológico de la inducción de PPAR γ | 53 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Fuentes de yodo en la naturaleza | 8 |
| Tabla 2. Comparación de secuencias de PPREs | 17 |
| Tabla 3. Algunos ligandos naturales y sintéticos de los receptores PPARs | 19 |
| Tabla 4. Clasificación de ligandos de acuerdo a su afinidad por PPAR γ | 20 |
| Tabla 5. Proteínas coactivadoras y correpresoras de PPAR γ | 21 |
| Tabla 6. PPAR γ y cáncer mamario <i>in vitro</i> | 23 |
| Tabla 7. Secuencia de oligonucleotidos para PCR de los PPARs. | 35 |
| Tabla 8. Comparación de pesos moleculares de receptores y ligandos | 41 |
| Tabla 9. Proteínas coactivadoras y correpresoras de PPAR α y PPAR β/δ | 73 |