



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Neurobiología

**CAPTURA Y EFECTO PROTECTOR DEL YODO EN EL  
CÁNCER DE PRÓSTATA**

TESIS

Que para optar por el grado de  
Doctora en Ciencias Biomédicas

PRESENTA:

Biol. Paloma Olvera Caltzontzin

TUTOR

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano  
Instituto de Neurobiología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Mahara Valverde Ramírez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Mauricio Díaz Muñoz  
Instituto de Neurobiología, UNAM

MEXICO D.F., 2014



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.

Agradezco a los miembros del Jurado por su tiempo y dedicación en la revisión de esta tesis, y por sus valiosos comentarios que la enriquecieron.

Dr. Manuel Salas Alvarado  
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano  
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Patricia García López  
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. María Elena Hernández Aguilar  
Universidad Veracruzana

Esta tesis se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología, UNAM. Campus Juriquilla, bajo la tutoría de la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano. Tesis financiada por CONACYT (127368, 176911) y PAPIIT (IN202513, IN200813).

Paloma Olvera Caltzontzin fue estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (UNAM) y contó con el apoyo de una beca de CONACYT (215709).

## CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN .....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
ANTECEDENTES .....	11
Próstata.....	11
Próstata Humana .....	12
Próstata Murina.....	13
Cáncer de Próstata .....	15
Epidemiología.....	15
Factores de Riesgo.....	16
Sintomatología.....	16
Diagnóstico .....	17
Tratamiento.....	17
Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del Cáncer de Próstata.....	18
Yodo.....	18
Química.....	19
Ingesta diaria recomendada .....	20
Participación del yodo en la fisiología tiroidea. ....	20
Captura de yoduro (I <sup>-</sup> ). Cotransportador Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup> (NIS).....	21
Expresión de NIS en tejidos extratiroideos.....	22
Captura de yodo molecular (I <sub>2</sub> ).....	23
Efectos antineoplásicos del yodo.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	26
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVOS .....	27
General.....	27
Particulares.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
Material Biológico .....	28
Ratones TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate).....	28
Diseño Experimental.....	28
Curso temporal de la captura de yodo radiactivo en la próstata normal y tumoral .....	28
Análisis de los transportadores que participan en la captura de yodo. Efecto del ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> en la captura de <sup>125</sup> I y de <sup>125</sup> I <sub>2</sub> .y análisis de la expresión de NIS en la próstata.....	29
Efecto protector del yodo en el cáncer prostático en un modelo in vivo.....	29
Métodos .....	30
Genotipificación.....	30
Oxidación de <sup>125</sup> I a <sup>125</sup> I <sub>2</sub> .....	30
Análisis Histológico.....	31
Cuantificación de T3 en suero mediante RIA.....	31
Evaluación de proliferación celular mediante inmunohistoquímica.....	31
Determinación de apoptosis mediante ELISA.....	32
Cuantificación de mRNA de NIS, p53 y p21 mediante RT-qPCR.....	32

Análisis Estadístico.....	33
RESULTADOS .....	35
Captura de yodo .....	35
Curso temporal de la captura de $^{125}\text{I}$ y $^{125}\text{I}_2$ en la glándula tiroides y próstata normal ...	35
Efecto del $\text{ClO}_4^-$ en la captura de yodo en glándula tiroides, y en la próstata normal y tumoral .....	36
Análisis de la expresión de NIS .....	38
Efecto del yodo en la prevención del cáncer prostático.....	39
Consumo de yodo .....	39
Peso corporal.....	40
Niveles circulantes de T3.....	41
Peso corporal y del tracto genitourinario (GUT) .....	41
Análisis Histopatológico.....	42
Efecto del yodo en la tasa de proliferación.....	43
Apoptosis .....	46
DISCUSIÓN .....	48
Captura de Yodo .....	48
Efecto del yodo en la prevención del cáncer prostático.....	49
CONCLUSIONES .....	53
PERSPECTIVAS.....	54
REFERENCIAS.....	55
ARTICULO .....	62

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6-IL	6-yodolactona
ANOVA	Análisis de varianza
$\text{ClO}_4^-$	Perclorato
cpm	Cuentas por minuto
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
GUT	Tracto genitourinario
H&E	Hematoxilina-eosina
$\text{I}^-$	Yoduro
$\text{I}_2$	Yodo molecular
ip	Intraperitoneal
NIS	Cotransportador $\text{Na}^+/\text{I}^-$
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PPAR	Receptores activados por la proliferación de peroxisomas
PSA	Antígeno específico de próstata
RIA	Radioinmunoanálisis
T3	Triyodotironina
Tag	Antígenos tumorales corto y largo
Tg	Tiroglobulina
TRAMP	Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate
WD	Cáncer bien diferenciado

## RESUMEN

La suplementación con yodo ejerce efectos antitumorales en diferentes tipos de cáncer. El yodo como yoduro ( $I^-$ ) y en su forma molecular ( $I_2$ ), es capaz de reducir la proliferación celular e inducir apoptosis en células humanas de cáncer de próstata (LNCaP y DU-145). De igual forma, ambas formas químicas disminuyen el tamaño del tumor en ratones desnudos con xenotrasplantes de células DU-145. El objetivo del presente trabajo es analizar la captura y los efectos del yodo en la prevención del cáncer de próstata en un modelo de ratón transgénico (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate [TRAMP, por sus siglas en inglés] mice/SV40-Tag antigens), el cual desarrolla cáncer de próstata a partir de las 12 semanas de edad. La captura de  $^{125}I^-$  y  $^{125}I_2$  se analizó en próstatas de ratones silvestres y TRAMP de 12 y 24 semanas de edad, en presencia de perclorato ( $ClO_4^-$ , inhibidor específico del cotransportador de  $Na^+/I^-$  [NIS]). La expresión de NIS se cuantificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los ratones de 6 semanas de edad fueron suplementados con 0.125 mg  $I^-$  más 0.062 mg  $I_2$  /ratón/día, por un periodo de 12 ó 24 semanas. Se analizó el peso del tracto genitourinario (GUT), el número de lesiones por acino, la proliferación celular (niveles de antígeno nuclear de proliferación celular [PCNA] por inmunohistoquímica), la expresión de p53 y p21 (por PCR cuantitativo) y la apoptosis (cuantificación de nucleosomas mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas [ELISA]). Se encontró que en ambos grupos de edad, la próstata normal y tumoral capta yodo, y sólo la captura de  $I^-$  se bloquea en presencia de  $ClO_4^-$ . La suplementación de yodo evitó la sobreexpresión de NIS en los ratones TRAMP, pero no tuvo un efecto significativo en el peso del tracto GUT, el fenotipo celular, la proliferación ni en la apoptosis. En los ratones TRAMP, la suplementación con yodo incrementó la expresión de p53, pero no tuvo efecto en p21 (gen dependiente de p53). Nuestros resultados confirman la participación de NIS en la captura de  $I^-$  y apoyan la noción de que el transporte de  $I_2$  es a través de otro transportador. La suplementación con yodo no previno la progresión del cáncer de próstata. La incapacidad de yodo para inducir arresto celular o apoptosis en el modelo TRAMP, podría explicarse por la continua y exacerbada expresión de la proteína Tag (inhibiendo p53 y Rb). Para entender mejor los efectos del yodo en el desarrollo del cáncer de próstata, serán necesarios estudios en modelos menos agresivos, cuyo mecanismo de acción no involucre la inactivación directa de p53.



## ABSTRACT

Iodine supplementation exerts antitumor effects in several types of cancer. Iodide ( $I^-$ ) and iodine ( $I_2$ ) reduce cell proliferation and induce apoptosis in human prostate cancer cells (LNCaP and DU-145). Both chemical species decrease tumor growth in athymic mice xenografted with DU-145 cells. The aim of this study was to analyze the uptake and effects of iodine in a preclinical model of prostate cancer (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate [TRAMP] mice/SV40-Tag antigens), which develops cancer by 12 weeks of age.  $^{125}I^-$  and  $^{125}I_2$  uptake was analyzed in prostates from wild-type and TRAMP mice of 12 and 24 weeks in the presence of perchlorate (inhibitor of the  $Na^+/I^-$  symporter [NIS]). NIS expression was quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Mice (6 weeks old) were supplemented with 0.125 mg  $I^-$  plus 0.062 mg  $I_2$ /mouse/day for 12 or 24 weeks. The weight of the genitourinary tract (GUT), the number of acini with lesions, cell proliferation (levels of proliferating cell nuclear antigen [PCNA] by immunohistochemistry), p53 and p21 expression (by qPCR) and apoptosis (relative amount of nucleosomes by enzyme-linked immunosorbent assay) were evaluated. In both age-groups, normal and tumoral prostates take up both forms of iodine, but only  $I^-$  uptake was blocked by perchlorate. Iodine supplementation prevented the overexpression of NIS in the TRAMP mice, but had no effect on the GUT weight, cell phenotype, proliferation or apoptosis. In TRAMP mice, iodine increased p53 expression but had no effect on p21 (a p53-dependent gene). Current data corroborate NIS involvement in  $I^-$  uptake and support the notion that another transporter mediates  $I_2$  uptake. Iodine did not prevent cancer progression. This result could be explained by a strong inactivation of the p53 pathway by Tag antigens.

## INTRODUCCIÓN

En los países occidentales, el cáncer de próstata es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada en varones mayores de 50 años (Center *et al.*, 2012). En México es la primera causa de muerte (INEGI, 2013). Particularmente Japón presenta una tasa de mortalidad por cáncer prostático dos veces menor en comparación con los países occidentales, y es bien conocido que la dieta puede influir en esta protección (GLOBOCAN, 2008; Hsing *et al.*, 2000). La dieta tradicional Japonesa es alta en pescado (rico en ácidos grasos omega 3), soya (isoflavonas) y algas (yodo) (Sonoda *et al.*, 1997). Estudios epidemiológicos apoyan la noción que entre varios factores, el alto consumo de yodo (algas marinas) en los japoneses, podría explicar la reducida incidencia de cáncer mamario y prostático (Hoption Cann *et al.*, 2007).

Actualmente se ha reconocido que el yodo, además de ser un micronutriente esencial en el metabolismo de la glándula tiroidea, participa en otros procesos extra-tiroideos, siendo un agente antioxidante, antiproliferativo y diferenciador, en los órganos capaces de captar yodo (glándula mamaria, mucosa gástrica, próstata) (Aceves *et al.*, 2013). Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento continuo con yodo molecular (I<sub>2</sub>), pero no con yoduro (I<sup>-</sup>), reduce la incidencia a desarrollar cáncer mamario en respuesta a la administración de un cancerígeno químico (García-Solís *et al.*, 2005). Además la dosis de yodo utilizada en estos estudios no tiene ningún efecto sobre la función tiroidea (Anguiano *et al.*, 2007). Estos hallazgos han sido corroborados en células humanas de cáncer mamario y confirman la participación de cuando menos dos mecanismos antineoplásicos: inhibición de la proliferación (arresto celular en G1 o G2/M) e inducción de la apoptosis (vía de las caspasas y AIF/PARP1) (Arroyo-Helguera *et al.*, 2006; 2008).

En el caso de la próstata, se ha mostrado que las células cancerosas captan yodo y que su administración ejerce un efecto apoptótico (vía BAX/BCL-2 y caspasas), observándose un efecto diferencial dependiendo de la forma química y del estado de diferenciación de las células. Mientras que el epitelio no canceroso es más sensible al I<sup>-</sup>, el epitelio canceroso diferenciado (LNCaP) lo fue a los efectos del I<sub>2</sub>. Aunado a esto, en ratones inmunosuprimidos con xenotrasplantes de células de cáncer prostático, se observó que la

suplementación con una mezcla de ambas formas químicas de yodo reduce significativa el crecimiento del tumor (Aranda *et al.*, 2013). Por todo lo anterior y dado que la próstata es un tejido que capta yodo, el propósito de esta tesis fue analizar los efectos preventivos del yodo en el desarrollo de cáncer de próstata en un modelo de ratón transgénico (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate [TRAMP]). Las ventajas de este modelo son que la progresión del cáncer mimetiza el desarrollo de la patología en el humano, no se requiere el uso de cancerígenos, y el sistema inmune del ratón está intacto (Kaplan-Lefko *et al.*, 2003).

## ANTECEDENTES

### Próstata

La próstata es una glándula de secreción exócrina que juega un papel importante en la reproducción masculina. En todas las especies, incluyendo los humanos, la próstata se desarrolla a partir del endodermo, específicamente del seno urogenital. Esta glándula sintetiza y secreta un conjunto de componentes (enzimas, lípidos, aminas, iones metálicos, etc.) esenciales para mantener la función y viabilidad de los espermatozoides. El desarrollo, la diferenciación y el mantenimiento de la próstata adulta depende primordialmente de la participación de esteroides sexuales, hormonas peptídicas y de factores de crecimiento (Kumar y Majumder, 1995; Marker *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2004).

Los tres principales tipos celulares presentes en el epitelio prostático son: células secretoras, células basales y células neuroendócrinas (Figura 1). Las células secretoras forman un acino, el cual contiene un lumen hacia donde se secretan y almacenan las secreciones prostáticas [fosfatasa ácida prostática y antígeno específico de próstata (PSA, por sus siglas en inglés), entre otras]. Las células secretoras constituyen el principal tipo celular presente en la glándula, expresan niveles altos del receptor a los andrógenos y dependen de estos para su crecimiento (Lang *et al.*, 2009). Por su parte, las células basales rodean a las células secretoras, no depende de andrógenos para su crecimiento y expresan niveles bajos o indetectables del AR (Kufe *et al.*, 2003). Se ha propuesto que estas células ejercen un control parácrino sobre la proliferación de las células epiteliales y del estroma (Cramer, 2007). Las células neuroendócrinas se caracterizan por presentar un fenotipo neurosecretor (Kufe *et al.*, 2003), y secretar una amplia gama de péptidos (Lang *et al.*, 2009). Las células troncales del epitelio prostático se encuentran en estado quiescente y se agrupan formando nichos (Lang *et al.*, 2009). Estudios recientes sugieren que las células troncales dan lugar a los diferentes linajes epiteliales, células secretoras, basales y neuroendócrinas de la próstata (Blackwood *et al.*, 2011).

A su vez, el epitelio prostático está rodeado de un estroma fibromuscular que provee de soporte a los ductos epiteliales y controla la diferenciación del epitelio. Los tipos celulares

del estroma son: nervios, vasos sanguíneos, músculo liso, tejido fibroso y linfático (Taylor y Risbridger, 2008).

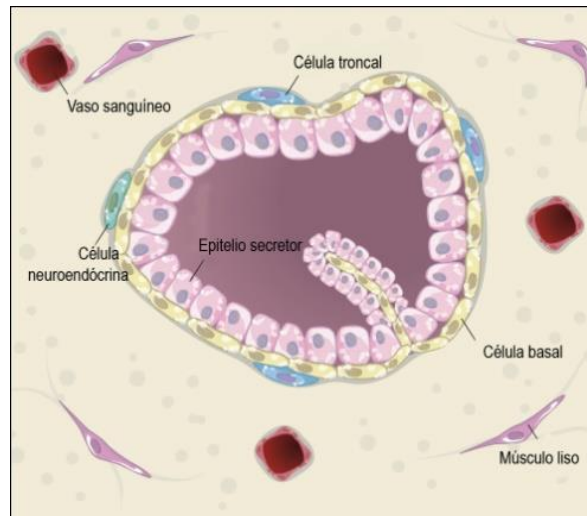


Figura 1. Esquema de la organización celular de la próstata (modificado de Cramer, 2007).

### *Próstata Humana*

La próstata se localiza en la pelvis, rodeada posteriormente por el recto y anteriormente por la vejiga (Kufe *et al.*, 2003). Inicialmente se sugirió que la próstata humana se desarrollaba con un patrón lobular, sin embargo después de una serie de estudios anatómicos de tejido normal y patológico, McNeal y colaboradores (1981, 1988) propusieron que la próstata adulta es mono-lobulada, y está conformada por zonas. Se han identificado tres zonas: la zona periférica, la zona central y la zona de transición (Figura 2) (Kufe *et al.*, 2003). Estas zonas son anatómicamente reconocibles, tienen una histología característica y una predisposición específica a enfermedades neoplásicas benignas o malignas (Shappell *et al.*, 2004).

La zona periférica de la próstata humana se caracteriza por presentar acinos simples, de forma redonda a ovalada y núcleos redondos. La zona central presenta acinos simples y largos y puede presentar proyecciones micropapilares y glándulas cribiformes que mimetizan una neoplasia epitelial prostática. Finalmente, la zona de transición está formada por acinos simples y pequeños, con núcleos redondos embebidos en un estroma fibromuscular (Kufe *et al.*, 2003; Shappell *et al.*, 2004; Bostwick *et al.*, 2008).

Anatómicamente, la zona periférica se encuentra distal a la uretra. Abarca cerca del 70% del volumen total de la próstata y es el sitio más común de neoplasia intraepitelial prostática (PIN, por sus siglas en inglés) y de carcinomas. Esta zona rodea los túbulos eyaculatorios y comprende la porción donde éstos se unen a la uretra, abarca cerca del 25% del volumen total de la próstata. La zona central pocas veces se relaciona como sitio de origen de cáncer, sin embargo se ve involucrada por la extensión del tumor de la zona periférica. Finalmente, la zona de transición que rodea la uretra, abarca el menor volumen de la próstata (5%), pero frecuentemente se alarga junto con el estroma fibromuscular y es susceptible a desarrollar hiperplasia prostática benigna (Kufe *et al.*, 2003; Shappell *et al.*, 2004; Bostwick *et al.*, 2008).

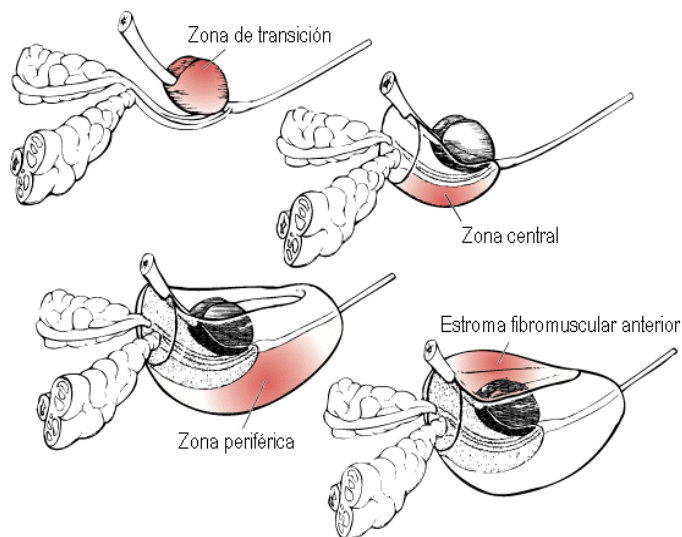


Figura 2. Zonas de la próstata humana. La próstata humana se divide en tres zonas: de transición, central y periférica (modificado de Kufe *et al.*, 2003).

### *Próstata Murina*

A diferencia de la próstata humana, la próstata murina está dividida en lóbulos, entre los que se encuentran: los anteriores o glándula coagulante, los ventrales, los dorsales y los laterales, éstos dos últimos comúnmente agrupados como lóbulo dorsolateral (Figura 3). Los lóbulos están compuestos de una serie de túbulos ramificados, rodeados por una delgada túnica fibromuscular, y a su vez cada lóbulo está recubierto por una fina cápsula revestida de mesotelio (Shappell *et al.*, 2004). Los lóbulos anteriores están unidos a la

superficie interna de las vesículas seminales, su conducto principal se encuentra unido a la uretra, opuesto a las vesículas seminales a lo largo de su curvatura (Shappell *et al.*, 2004). El lóbulo ventral consiste de un par de lóbulos localizados debajo de la vejiga. El lóbulo lateral está unido lateralmente al lóbulo ventral y está contenido por la misma cápsula. El complejo dorsolateral está localizado en el área triangular entre el lado lateral de las vesículas seminales y el de la uretra (Sugimura *et al.*, 1986).

En la Tabla 1 se muestran las características histológicas de los lóbulos de la próstata murina.

Frecuentemente el lóbulo dorsolateral se ha definido como homólogo a la zona periférica de la próstata humana (Price, 1963; Cunha *et al.*, 1987), pues se ha mostrado que ambas estructuras presentan patrones similares de expresión génica (Berquin *et al.*, 2005).

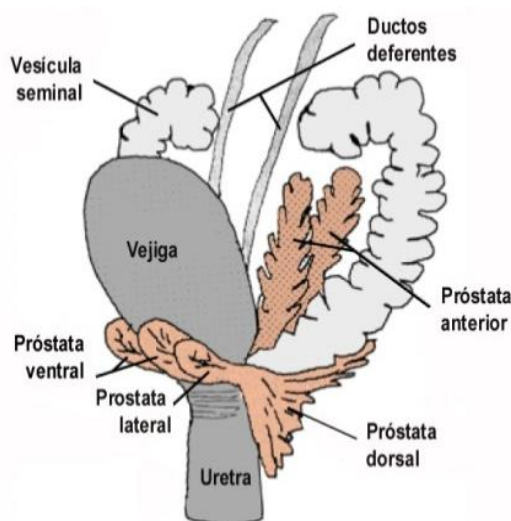


Figura 3. Lóbulos de la próstata murina. La próstata de ratón se divide en cuatro lóbulos: ventral, lateral, dorsal y anterior (tomado de Abate-Shen y Shen, 2002).

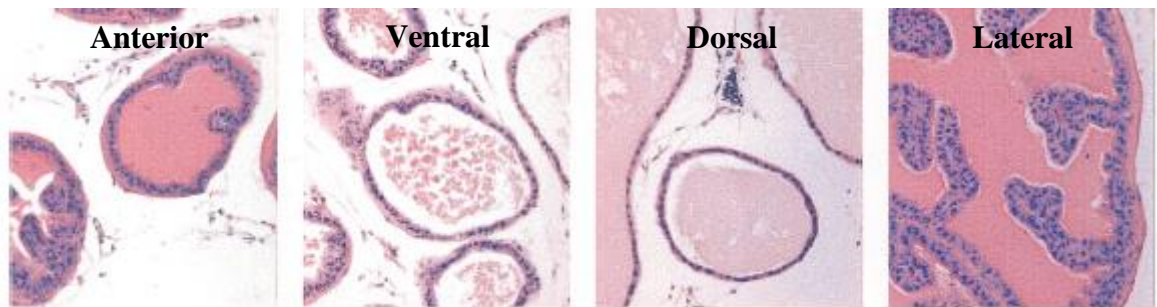
## Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata es una neoplasia maligna que se presenta en los hombres de edad avanzada; su ocurrencia se incrementa rápidamente después de los 50 años y la mediana de edad al momento del diagnóstico es de 72 años (Súchil, 2001).

### Epidemiología

A nivel mundial estos tumores ocupan el segundo lugar de incidencia y son la sexta causa de mortalidad en varones (Center *et al.*, 2012). Según reportes del INEGI en México, en el año 2011 el cáncer de próstata ocupó el primer lugar en incidencia (7.9 %) y de mortalidad (16.9 %) en varones (INEGI, 2013).

Tabla 1. Características histológicas de los lóbulos de la próstata de ratón.



Características	Lóbulo Anterior	Lóbulo Ventral	Lóbulo Dorsal	Lóbulo Lateral
Epitelio	Columnar	Columnar	Columnar	Cuboidal
Localización del núcleo	Central	En la base	En el centro o en la base	En la base
Plegamiento epitelial	Escasos	Escasos	Moderados	Escasos
Secreciones (positivas a eosina)	Homogéneas y serosas (++)	Homogéneas y serosas (+)	Homogéneas (++)	Particuladas (++)

A pesar de las altas tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial, hay una gran variación entre países. Las tasas más altas son en Norteamérica, el Oeste de Europa y



Australia y Nueva Zelanda (85.6-104.2 por cada 100,000 habitantes en el año 2008). Mientras que los países Asiáticos tienen las tasas de incidencia más bajas (4.1-13.8 por cada 100,000 habitantes en el año 2008) (Center *et al.*, 2012).

### *Factores de Riesgo*

Los únicos factores de riesgo bien establecidos para el cáncer de próstata son la edad, la raza y los antecedentes familiares (García *et al.*, 2007; Giovannucci *et al.*, 2007).

Edad. Más del 85% de los casos de cáncer de próstata se diagnostican en hombres mayores de 65 años. El diagnóstico es muy bajo antes de los 50 años, pero después de esta edad la incidencia y mortalidad se incrementa exponencialmente (Patel y Klein, 2009).

Raza. Los Afroamericanos y los Jamaicanos descendientes de Africanos, tienen las tasas de incidencia de cáncer de próstata más elevada a nivel mundial, con una probabilidad 2.5 veces mayor de padecer esta enfermedad respecto a los caucásicos (García *et al.*, 2007).

Antecedentes Familiares. Estudios recientes muestran que los antecedentes familiares son responsables de un 5-10 % del total de los casos de pacientes con cáncer de próstata. Los estudios sugieren que el riesgo es mayor cuando el paciente afectado es un hermano que cuando es el padre (Haas y Sakr, 1997; Zeegers *et al.*, 2003; Lozano, 2004; García *et al.*, 2007). Se ha propuesto que mutaciones en algunos genes, como HPC1, RNASEL, MSR1, AR, CYP17 y SRDA2, están relacionadas con la incidencia de cáncer prostático familiar (Nelson *et al.*, 2003).

Otros factores. Aunque menos estudiados, se ha sugerido que existen otros factores asociados al riesgo de padecer cáncer de próstata, como los hormonales, la vasectomía y la circuncisión (infección e inflamación) y el estilo de vida (dieta, consumo de alcohol y tabaco) y los ocupacionales (exposición a cancerígenos) entre otros. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia suficiente para confirmar esta relación (Súchil, 2001).

### *Sintomatología*

En etapas tempranas el cáncer de próstata no suele presentar síntomas. Conforme avanza la enfermedad y crece la próstata, los individuos presentan alteraciones urológicas como debilidad o interrupción en el flujo de la orina; dificultad para iniciar o terminar el flujo;

necesidad de orinar, sangrado frecuente; dolor o ardor al orinar. Algunos de estos síntomas son similares a los causados por la hiperplasia prostática benigna (García *et al*, 2007).

### *Diagnóstico*

El diagnóstico del cáncer de próstata se hace con la ayuda de diversos métodos invasivos y no invasivos. El análisis de marcadores en sangre en conjunto con la exploración de la próstata son los principales métodos empleados en la clínica.

Tacto rectal. Es un método subjetivo que requiere entrenamiento y experiencia y sólo permite palpar la zona lateral y posterior de la glándula. El tacto rectal no es aceptado como único método de diagnóstico (Lozano, 2004; Cramer, 2007).

Pruebas de laboratorio (marcadores séricos). De modo preferente se utilizan el PSA, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina prostática. Hasta el momento el PSA es el marcador por elección de los que se citan en la bibliografía médica. Es una glicoproteína órgano-específica, pero no cáncer-específica, por lo que un valor elevado se puede relacionar con hiperplasia benigna de próstata, retención urinaria o prostatitis. Un valor de antígeno prostático de 4 ng/ml se ha utilizado tradicionalmente como límite superior de la normalidad de la prueba (Lozano, 2004; Cramer, 2007).

Técnicas de imagen. Por el momento no existe una técnica de imagen estándar para el diagnóstico del cáncer de próstata. La ultrasonografía transrectal estándar, resonancia magnética nuclear, tomografía axial computarizada y rastreos óseos no son suficientes cuando se utilizan como único método de diagnóstico, debido a que no puede diferenciarse entre nódulos benignos y malignos (Lozano, 2004; Cramer, 2007).

Otros procedimientos. Incluye biopsia con aguja guiada con ultrasonidos de gran valor en la detección. La confirmación histológica mediante biopsia se considera el estándar de referencia. Sin embargo, las biopsias se realizan sólo cuando las pruebas descritas anteriormente son sospechosas de cáncer (Lozano, 2004; Cramer, 2007).

### *Tratamiento*

Las opciones de tratamiento varían dependiendo de la edad, la etapa del cáncer y otras condiciones médicas. La cirugía y la braquiterapia (radioterapia local) se pueden usar en

etapas tempranas. La terapia antihormonal, quimioterapia y radioterapia externa, o la combinación de éstas, se usan para tratar la metástasis, o como terapia adicional en etapas tempranas. El tratamiento antihormonal puede controlar el cáncer de próstata por largos periodos, disminuyendo el tamaño del tumor y aminorando el dolor y algunos síntomas. Inicialmente el cáncer de próstata es dependiente de andrógenos, por lo que la terapia antihormonal es el primer tratamiento para la metástasis. En algunos casos los tumores se hacen resistentes a la falta de andrógenos, por lo que se requiere de terapias adicionales para tumores resistentes a los andrógenos (Lozano, 2004; Garcia *et al*, 2007; Shafi *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta el momento la mayoría de los tratamientos son invasivos y tienen serios efectos secundarios.

#### *Mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del Cáncer de Próstata*

La caracterización de las vías moleculares involucradas en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata es un reto, pues los tumores son heterogéneos y multifocales. Sin embargo, con la ayuda de herramientas moleculares ha sido posible identificar algunos genes asociados con esta patología. Se conoce que son hereditarios de un 5-10% de los cánceres diagnosticados y se han identificado alteraciones en genes particulares (HPC1 o RNASEL, PCAP, HPCX, CAPB, HPC20, HPC2/ELAC2, HSD3B, MSR1, NBS1 y CHEK2). El resto de los cánceres tienen un origen no-hereditario y se han identificado que las alteraciones (mutaciones, sobreexpresión y nula expresión) en genes supresores de tumores (p53, PTEN, p27, NKX3.1, Retinoblastoma, entre otros) como de oncogenes (c-MYC, c-ErbB2, Bcl-2, Prostate stem cell antigen, ERG y ETV1, STAT5, entre otros), los cuales son cruciales para el desarrollo y progresión del cáncer (Frank y Miranti, 2013; Irshad y Abate-Shen, 2013; Mazaris y Tsiotras, 2013) (Figura 4).

#### **Yodo**

El yodo (I) es un elemento esencial para el funcionamiento de la glándula tiroides. Es un elemento no metálico, clasificado dentro del grupo de los halógenos. Constituye sólo 0.0001% de la litósfera y en la naturaleza se encuentra en forma de yoduro (I<sup>-</sup>) en algunas salmueras de pozos de petróleo en California, Michigan y Japón, y en el agua de mar, de donde es captado por las algas marinas (Dunn, 1998; Gottardi, 2001). Las algas marinas

acumulan yodo principalmente en forma molecular ( $I_2$ ) y de ácido hipoyodoso. En la forma de yodato de calcio, el yodo se encuentra en los mantos de caliche de Chile. Se encuentra también como ion yoduro (Carrasco, 1993).

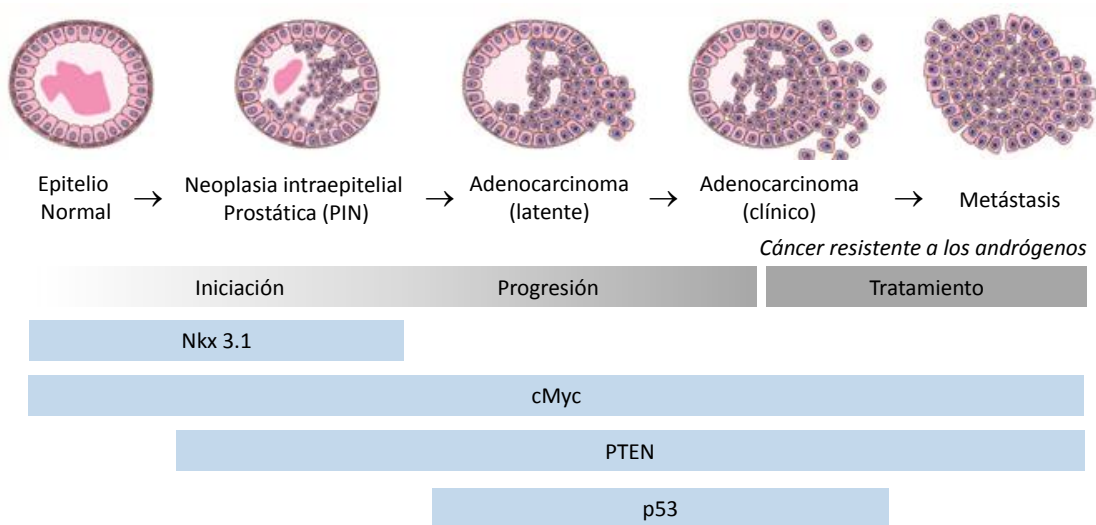


Figura 4. Genes alterados durante las etapas del desarrollo del cáncer de próstata. La falta de función de Nkx 3.1, PTEN y p53 están asociadas con el desarrollo del cáncer de próstata, mientras que en el caso de cMyc es su sobreexpresión la que favorece el desarrollo de la patología. Cada gen participa de manera diferencial a lo largo del desarrollo del cáncer. Se muestran los genes más estudiados (modificado de Irshad y Abate-Shen, 2013).

### Química

El yodo es el halógeno con el peso atómico más alto (126.9 g/mol). Forma escamas metálicas de grisáceas a negras que se fusionan a los 113.5 °C formando un líquido color negro. Su punto de ebullición es a los 184.4 °C a presión atmosférica y produce un vapor color violeta. El yodo actúa con valencias de  $\pm 1$ , +3, +5 y +7, lo que le permite presentar diversas formas químicas. El yodo en su forma molecular ( $I_2$ ) es ligeramente soluble en agua (338.3 ppm, 25°C, pH 5), formando una solución café. En condiciones fisiológicas el yodo se encuentra principalmente en forma de  $I^-$  y puede ser transformado a diversas formas oxidadas a través de mecanismos enzimáticos (Thrall et al., 1992). La poca solubilidad del  $I_2$  se incrementa con la adición de yoduros alcalinos, formando triyodos ( $I_3^-$ ), pentayodos ( $I_5^-$ ) y hexayodos ( $I_6^-$ ), como ocurre en una solución de Lugol (Gottardi, 2001).

### *Ingesta diaria recomendada*

El yodo es escaso en la naturaleza y es suplementado en el organismo sólo a través de la dieta. Es indispensable para la síntesis de hormonas tiroideas, por lo que el consumo insuficiente de yodo de la dieta, puede causar hipotiroidismo, bocio, retraso en el crecimiento y en el desarrollo psicomotor, así como retraso mental irreversible (cretinismo) (Carrasco, 1993; Nicola *et al.*, 2009). Aunado a estos efectos, el yodo también ejerce de manera directa (no mediado por hormonas tiroideas) efectos extratiroideos (Aceves *et al.*, 2013).

La ingesta recomendada para mantener la fisiología tiroidea son 150  $\mu\text{g}$  de yodo al día para adultos y 200  $\mu\text{g}$  para mujeres embarazadas o lactando. Esta recomendación proviene del Consejo Internacional para el Control de Desórdenes causados por deficiencia de yodo, la Organización Mundial de la Salud y el UNICEF, entre otros (Dunn, 1998).

Los límites superiores de consumo de yodo varían entre individuos y poblaciones. Un consumo de 1 mg de yodo por día son seguros para la mayoría de las personas, y se ha reportado que cantidades más elevadas son generalmente toleradas (Dunn, 1998; Pearce, 2007). Se ha observado que las poblaciones Japonesas consumen altas cantidades de yodo (alrededor de 7 mg diarios) a partir de la dieta, la cual es rica en algas marinas. Según datos estimados, el promedio de consumo diario de yodo por los japoneses varía de 5 a 13 mg. Comparado con los 167  $\mu\text{g}$  consumidos en Estados Unidos, la población Japonesa consume de 5 a 14 veces más yodo que el límite superior recomendado (1 mg). Sin embargo, estos altos niveles de yodo no inhiben la función de la glándula tiroides (Patrick, 2008).

### *Participación del yodo en la fisiología tiroidea.*

La captura de yoduro ( $\text{I}^-$ ) por las células foliculares de la glándula tiroides involucra un proceso que requiere energía (dependiente de ATPasa) y de un transportador membranal. El transporte de  $\text{I}^-$  al interior de la célula ocurre en contra de gradiente de concentración y eléctrico. Este proceso permite que la glándula tiroides concentre de 30 a 50 veces más yodo de los niveles circulantes. La captura activa de  $\text{I}^-$  es el primer punto de control para la síntesis de hormonas y es estimulada por la hormona estimulante de la tiroides [TSH] (Nussey y Whitehead, 2001).

La síntesis y almacenamiento de hormonas tiroideas ocurre en las células foliculares y el coloide. Los diferentes folículos pueden estar en diferentes estados de actividad (Nussey y Whitehead, 2001). A continuación se describe brevemente la participación del yodo en la síntesis de hormonas tiroideas.

El I es transportado activamente en contra de gradiente de concentración a través de la membrana basolateral de las células foliculares de la glándula tiroides, utilizando un transporte activo secundario. Una vez dentro de las células foliculares, el I es oxidado a I<sub>2</sub> por una reacción catalizada por la enzima tiroperoxidasa (TPO). Después es incorporado a residuos de tirosina de la tiroglobulina (Tg). Una vez yodada, la Tg es llevada al coloide, donde se acoplan pares de tirosinas yodadas, el acoplamiento de dos residuos de tirosina, cada una yodada en dos posiciones (diyodotirosina, DIT) produce tetrayodotironina o tiroxina (T<sub>4</sub>), mientras que la combinación de DIT con monoiodotirosina (MIT) produce triyodotironina (T<sub>3</sub>). En respuesta a la demanda de hormonas tiroideas, ocurre la hidrólisis fagolisosomal de Tg yodada. T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> se secretan al torrente sanguíneo; las hormonas no secretadas se metabolizan a tirosina y I, una reacción catalizada por la enzima microsomal yodotirosina deshalogenasa. Todos estos pasos son estimulados por la TSH. A diferencia de la biosíntesis de otras hormonas de otras glándulas endocrinas, la producción en la glándula tiroides ocurre principalmente en el coloide, un compartimiento extracelular (Carrasco, 1993; Nussey y Whitehead, 2001).

#### *Captura de yoduro (I). Cotransportador Na<sup>+</sup>/I (NIS)*

El transporte de yoduro (I) es un proceso altamente especializado presente principalmente, pero no exclusivamente, en la glándula tiroides (Carrasco, 1993). La acumulación activa de I ha sido ampliamente estudiada en la glándula tiroides. La captura es mediada por NIS, una glicoproteína con 13 dominios transmembranales. NIS es una proteína integral de la membrana basolateral de las células foliculares de la glándula tiroides. El NIS utiliza la fuerza del gradiente de concentración del Na (transmembranal) y cotransporta 2 iones Na<sup>+</sup> y un ión I. El transporte de I genera una carga neta positiva (una corriente interna) que despolariza la membrana. Este sistema de captura está acoplado a una ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, encargada de sacar Na<sup>+</sup> e introducir K<sup>+</sup> (Eskandari, 1997; Chung, 2002; Nicola *et al.*, 2009).

Regulación de la expresión de NIS. La TSH y la vía de la adenosina monofosfato cíclica (cAMP), favorecen la expresión de NIS en la glándula tiroides. Además, otros factores como la insulina, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el factor de crecimiento epidérmico y el  $I^-$  por sí mismo, también influyen en la captura de yoduro en la glándula tiroides (Chung, 2002).

A diferencia de la glándula tiroides, la captura de  $I^-$  en tejidos no tiroideos parece no estar influenciada por TSH. En ratones, la prolactina y el estradiol favorecen la captura de  $I^-$  en la glándula mamaria lactante y no lactante respectivamente. No obstante, el estradiol y la progesterona han mostrado inhibir y estimular respectivamente, la captura de  $I^-$  en el útero y en el oviducto de la rata (Cann *et al.*, 1999).

Selectividad de aniones por NIS. La constante de afinidad de NIS para el  $I^-$  es de  $33 \pm 9 \mu M$  a  $-50 mV$ . Además del  $I^-$ , hay una variedad de aniones que también son transportados por NIS:  $I^- \geq SeCN^- > SCN^- > ClO_3^- > NO_3^-$ . Aparentemente el común denominador para el transporte de sustratos es la monovalencia aniónica (Eskandari, 1997).

También hay varios aniones capaces de inhibir el transporte del  $I^-$ . El más potente ( $K_i^{ClO_4^-} = 1.8 \pm 0.4 \mu M$ ) es el perclorato ( $ClO_4^-$ ). Este anión inorgánico puede estar presente naturalmente en la tierra o ser producido sintéticamente. El  $ClO_4^-$  se usa tradicionalmente como inhibidor por competencia de la captura de  $I^-$  en la glándula tiroides (Eskandari, 1997). Datos previos sugerían que el  $ClO_4^-$  no era transportado por NIS, pues al hacer pruebas electrofisiológicas expresando NIS en ovocitos de *Xenopus* y en células ováricas del hamster Chino, se encontró que el  $ClO_4^-$  no generaba corriente (Eskandari, 1997; Yoshida *et al.*, 1997). Sin embargo recientemente se demostró en células de epitelio mamario, que el  $ClO_4^-$  si es transportado a través de NIS, generando una corriente electroneutra y sugiriendo que NIS transloca diferentes sustratos con distintas estequiometrías (Dohán *et al.*, 2007). El orden de selectividad de bloqueo de la glándula tiroides es:  $ClO_4^- > ReO_4^- > SCN^- > I^- > Br^-$  (Van Sande *et al.*, 2003).

#### *Expresión de NIS en tejidos extratiroides*

Además de la glándula tiroides, NIS regula la captura de  $I^-$  en algunos tejidos, incluyendo la glándula mamaria lactante, el intestino, la mucosa gástrica y las glándulas

salivales. En estos tejidos, NIS está localizado en la superficie basolateral de las células epiteliales. En la glándula mamaria lactante, NIS transloca  $I^-$  del torrente sanguíneo al epitelio mamario, favoreciendo con esto la suplementación de  $I^-$  al recién nacido. Tanto en la mucosa gástrica, como en las glándulas salivales, NIS transporta  $I^-$  del torrente sanguíneo a las células epiteliales, de donde el  $I^-$  se libera a los jugos gástricos y a la saliva, respectivamente. Se desconoce el significado funcional de la captura de  $I^-$  en estos tejidos, pero se han sugerido efectos antimicrobianos y antioxidantes (Nicola *et al.*, 2009).

Utilizando técnicas de RT-PCR e hibridación Southern se han encontrado transcritos de NIS en diversos tejidos normales humanos, como la glándula parótida, la hipófisis, la próstata, el ovario, las glándulas adrenales, el corazón, el timo y los pulmones (Spitzweg *et al.*, 1998). Además, recientemente se ha demostrado con análisis inmunohistoquímicos, que también los tejidos tumorales humanos, incluyendo la próstata, los ovarios, los pulmones y el endometrio expresan NIS (Wapnir *et al.*, 2003; Navarra *et al.*, 2010). Sin embargo, la regulación y función tejido-específica de NIS aún se desconocen (Spitzweg *et al.*, 1998).

#### *Captura de yodo molecular ( $I_2$ )*

La acumulación de  $I_2$  en algas cafés (*Laminaria* spp) no depende directamente de ATP, sugiriendo que se trata de un mecanismo de difusión facilitada (Küpper *et al.*, 1998). Coincidentemente, en células de cáncer mamario humano MCF-7, se ha demostrado que la captura de  $I_2$  es distinta a la de  $I^-$ . Esta captura es saturable ( $> 5 \mu M$ ), tiene alta afinidad ( $k_m$   $0.91 \mu M$ ) y alta velocidad ( $V_{max}$   $1.13 \text{ pmol/min}/10^4 \text{ cels}$ ). Además, depende de síntesis de proteínas, pero es independiente de ATP y de la ATPasa  $Na^+/K^+$ . En conjunto estos datos sugieren que se trata de un mecanismo de difusión facilitada, como el reportado en las algas cafés (Arroyo-Helguera *et al.*, 2006).

#### *Efectos antineoplásicos del yodo*

Estudios recientes en diversos tejidos (glándula tiroidea, mama, neuroblastoma) sugieren que el yodo participa en diversos procesos antitumorales (Lui *et al.*, 2009, 2010; Aceves *et al.*, 2013; Godoy-García *et al.*, 2013). Estudios clínicos muestran que la suplementación con yodo molecular ( $I_2$ ) reduce la fibrosis mamaria, la mastalgia cíclica y la hiperplasia mamaria. Este efecto también se ha observado en modelos *in vivo* de cáncer mamario,



donde la suplementación con  $I_2$  retrasa la aparición de tumores inducidos químicamente en ratas. En este mismo modelo, la suplementación de  $I_2$  en coadyuvancia con quimioterapia (doxorubicina), ejerce efectos antineoplásicos y cardioprotectores. Los mecanismos implicados no son totalmente comprendidos, pero se ha sugerido que la apoptosis (vía PPAR $\gamma$ /Bax) y una acción antioxidante directa, podrían ser parte de los mecanismos primarios. En modelos *in vivo* como *in vitro* (células de cáncer mamario, de neuroblastoma, cáncer de glándula tiroides y en carcinoma de pulmón), el  $I_2$  también ejerce efectos antiproliferativos (interacción con el metabolismo de estrógenos o con receptores activados por la proliferación de peroxisomas [PPAR]) y apoptóticos (BAX/BCL-2, AIF, PARP, caspasa 7 y vía MAPKs). Es interesante notar que las células mamarias no cancerosas (MCF-10) son menos sensibles a los efectos del  $I_2$  (Ghent *et al.*, 1993; Eskin *et al.*, 1995; Funahashi *et al.*, 1996; Kessler, 2004; García-Solís *et al.*, 2005; Arroyo-Helguera *et al.*, 2006; Shrivastava *et al.*, 2006; Arroyo-Helguera *et al.*, 2008; Rösner, 2009; Lui *et al.*, 2009, 2010; Godoy-García *et al.*, 2013; Alfaro *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado que la suplementación con yodo no se acompaña de efectos secundarios en la salud de animales y humanos. En la glándula mamaria el  $I^-$  parece no tener efectos antineoplásicos, debido a que carece de los mecanismos necesarios (peroxidasa) para generar la forma biológicamente activa ( $I_2$ ) (García-Solís *et al.*, 2005).

Otro mecanismo mediante el cual el  $I_2$  ejerce sus efectos antineoplásico además del antioxidante, es la prevención de formación de aductos. La suplementación de una mezcla de yodo molecular con yoduro (0.05%/0.05%) a ratas con cáncer mamario inducido con dimetilbenz[a]antraceno (DMBA), ejerce efectos antineoplásicos previniendo la formación de aductos de DNA inducidos por estrógenos e induciendo apoptosis a través de PPAR $\gamma$  y caspasas. Además, ningún efecto dañino se observó en la glándula tiroides, sugiriendo que el tratamiento con yodo puede ser un tratamiento para el cáncer mamario en mujeres premenopáusicas (Soriano *et al.*, 2011).

Aunado a esto, existe evidencia de que el  $I_2$  se puede unir a lípidos y formar yodolípidos, como la 6-yodolactona (6-IL). Este lípido yodado replica algunos de los efectos antineoplásicos del  $I_2$  mencionados previamente, y actúa como ligando de los PPAR

(Langer *et al.*, 2003, Arroyo-Helguera *et al.*, 2008; Aceves *et al.*, 2009; Nuñez-Anita *et al.*, 2009; Thomasz *et al.*, 2010).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La próstata es un tejido altamente susceptible a desarrollar patologías benignas (hiperplasia/hipertrofia) y malignas (cáncer). Experimentos de nuestro laboratorio han mostrado que la próstata normal de rata capta yodo en su forma molecular ( $I_2$ ) y como yoduro ( $I^-$ ). Más aún, hemos mostrado que el suplemento con ambas formas químicas de yodo evita la hiperplasia prostática asociada a hormonas, lo cual se acompaña de un menor contenido de ADN (Aceves y Anguiano, 2009).

Estudios de nuestro laboratorio muestran que las células de la próstata humana captan yodo en forma de  $I^-$  y  $I_2$ , y a diferencia del cáncer mamario, el tratamiento con estas dos formas químicas induce apoptosis (vía caspasas). Se ha mostrado un efecto diferencial, el cual depende de la forma química del yodo y del estado de diferenciación de las células. Mientras que las células no cancerosas (RWPE-1) son más sensibles al efecto antiproliferativo del  $I^-$ , las células cancerosas diferenciadas (LNCaP) lo son al  $I_2$ . Por otro lado, en un modelo de ratón desnudo (nu/nu) con xenotrasplantes de células de cáncer de próstata humano (DU-145), la suplementación con una mezcla de  $I_2/I^-$  por 21 días disminuye el crecimiento del tumor, en comparación con un ratón que no recibió tratamiento. De igual forma, el tratamiento con 6-IL disminuye la tasa de proliferación e induce apoptosis en ambas líneas celulares, siendo las células no cancerosas más sensibles al efecto de este yodolípido. Estos datos han permitido sugerir que es a través de este yodolípido que el yodo ejerce sus efectos (Aranda *et al.*, 2013).

Con base en estos antecedentes, el presente trabajo pretende evaluar la captura y los efectos preventivos del yodo en el modelo de ratón TRAMP, el cual cuenta con los mecanismos de iniciación y progresión tumoral.

## **HIPÓTESIS**

La próstata de ratón captará yodo y su aporte continuo retrasará el desarrollo del cáncer.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar la captura y el efecto antineoplásico del yodo en el desarrollo de cáncer de la próstata.

### **Particulares**

- 1) Caracterizar el curso temporal y la participación de NIS, en la captura de  $I^-$  e  $I_2$ , en la próstata normal y tumoral del ratón.
- 2) Analizar el efecto de la suplementación de yodo ( $I^-$  e  $I_2$ ), sobre la expresión de NIS, en la próstata normal y tumoral del ratón.
- 3) Analizar el efecto de la suplementación de yodo, en la incidencia de lesiones prostáticas.
- 4) Analizar el efecto de la suplementación de yodo, en la proliferación y apoptosis en la próstata normal y/o tumoral.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material Biológico**

#### *Ratones TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate)*

De los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine), se adquirió el pie de cría de los ratones TRAMP. Estos ratones fueron generados en ratones C57BL/6, por una microinyección de un fragmento que contiene el oncogén SV40 acoplado a un elemento regulador de la probasina de rata (PB; -426/+28). Esta construcción se encuentra bajo el control de andrógenos, por lo que a partir de la pubertad se expresan los antígenos tumorales corto y largo (T/t; Tag), los cuales inactivan proteínas clave del ciclo celular e inducen el desarrollo de hiperplasia (8 semanas), neoplasia (12 semanas) y metástasis en un 100 % de incidencia (24-30 semana) (Greenberg *et al.*, 1995). Los ratones TRAMP se mantuvieron en el Bioterio del INB (UNAM), bajo condiciones controladas de temperatura ( $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e iluminación (12:12 horas). Tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento (Purina rat chow; Ralston Purina Co., St. Louis, M). La genotipificación se realizó por medio de un PCR a partir de una biopsia de cola, en la Tabla 2 se muestra la secuencia de oligonucleótidos (Greenberg *et al.*, 1995; Gingrich *et al.*, 1999). Los ratones heterocigotos expresan el transgen y se denominan TRAMP, mientras que los homocigotos no lo expresan y se denominan WT (wild type por sus siglas en inglés). El día de los experimentos, los ratones fueron anestesiados con 8 mg de ketamina y 0.6 mg de xilazina por cada 100 g de peso corporal y fueron sacrificados por decapitación. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, y los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo la guía de la Norma Oficial Mexicana NOM- 062 ZOO-1999.

### **Diseño Experimental**

#### *Curso temporal de la captura de yodo radiactivo en la próstata normal y tumoral*

El análisis de la captura de  $\text{I}^{-}$  y  $\text{I}_2$  se realizó utilizando trazadores radiactivos (NEN Life Science Products, Boston, MA). La oxidación de  $^{125}\text{I}^{-}$  a  $^{125}\text{I}_2$  se llevó a cabo con el método

descrito por McAlpine (1945), Thrall y colaboradores (1992). A un grupo de ratones machos WT o TRAMP, de 12 ó 24 semanas de edad, se les administraron 30  $\mu\text{Ci}$ /ratón de  $^{125}\text{I}_2$  ó  $^{125}\text{I}^-$  por vía intraperitoneal (ip). Los ratones se sacrificaron por decapitación desde los 5 y hasta los 180 minutos post-administración; se extrajeron la glándula tiroides (control positivo), el hígado (control negativo) y la próstata. Los tejidos se pesaron y se cuantificó la radiactividad en cuentas por minuto (cpm) en un contador de emisiones gamma (Packard, Palo Alto, CA). Los datos se expresaron de la siguiente manera: (cpm tiroides o próstata)/(cpm hígado). Un cociente  $\leq 1.0$  significa que no hubo captura.

*Análisis de los transportadores que participan en la captura de yodo. Efecto del  $\text{ClO}_4^-$  en la captura de  $^{125}\text{I}^-$  y de  $^{125}\text{I}_2$ , y análisis de la expresión de NIS en la próstata*

La participación del NIS se evaluó mediante la administración de un inhibidor específico, el  $\text{ClO}_4^-$ . Se administró una dosis de 2.5 mg/kg de peso corporal, por vía ip en solución salina fisiológica. Una hora después se administraron por vía ip, 30  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}_2$  ó  $^{125}\text{I}^-$  y los animales se sacrificaron 120 minutos después, siguiendo el procedimiento descrito previamente. La expresión del mRNA de NIS se analizó en la próstata normal y tumoral mediante PCR tiempo real.

*Efecto protector del yodo en el cáncer prostático en un modelo in vivo*

La mezcla de yodo se administró a los ratones en el agua de beber en una solución de 10% de  $\text{I}^-$  y 5% de  $\text{I}_2$  en agua destilada, diluido a una concentración final de 0.025% (0.125 mg  $\text{I}^-$ /día y 0.062 mg  $\text{I}_2$ /día). El tratamiento inició a partir de la sexta semana de edad y se continuó por 12 ó 24 semanas. Se formaron dos grupos de ratones WT y TRAMP, los cuales a su vez se subdividieron en dos subgrupos: los que consumieron agua natural y los que consumieron agua suplementada con la mezcla de yodo al 0.025%. Cada dos semanas se registró el peso de los animales. Continuamente los animales TRAMP fueron palpados y en el caso de la aparición de algún tumor palpable  $\geq 20$  mm los animales fueron sacrificados por normas bioéticas. Al terminar el tratamiento los animales se anestesiaron y se sacrificaron por decapitación. Se colectó sangre (cuantificación de hormona T3). Se registró el peso del tracto genitourinario (GUT), que incluye vejiga, vesículas seminales, uretra, glándula ampular y próstata. Se extrajo el tejido prostático y se fijó en formalina

para su posterior análisis histopatológico (diagnóstico y frecuencia de lesiones). La proliferación celular se analizó mediante métodos inmunohistoquímicos (antígeno nuclear de proliferación celular [PCNA]) y moleculares (expresión génica de p53 y p21). La apoptosis se analizó con métodos fluorescentes (Cuantificación de mono- y oligonucleosomas).

## **Métodos**

### *Genotipificación*

La presencia del transgen se detectó por medio de PCR, a partir de DNA extraído de una biopsia de cola. El tejido de la cola fue digerido por 12 horas (55 °C), en un buffer de lisis [100 mM de Tris-HCL 1M (pH 8); 10 mM de EDTA 0.5 M (pH 8); 0.5 % de Tween 80 ó 20 y 0.5 % de NP-40], adicionado con proteinasa K (2 µg/µL). Al día siguiente la proteinasa K fue inactivada con una incubación a 80°C por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron (3 minutos a 7,000 rpm) y se recuperó el sobrenadante (ADN), el cual se usó como templado para el PCR. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos, el primero amplifica un fragmento del oncogen SV40 (~474 pb) y el segundo amplifica un fragmento de una proteína constitutiva, Tcrd (cadena delta del receptor de células T) (~200 pb). Las secuencias de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 2. Las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C por 90 segundos seguidos por 12 ciclos a 94°C por 2° segundos, 64°C por 30 segundos (disminuyendo 0.5°C por ciclo) y 72 °C por 35 segundos (para SV40); 18 ciclos a 94°C por 20 segundos; 58°C por 30 segundos y 72 °C por 35 segundos (para Tcrd); una extensión final a 72 °C por 2 minutos y se mantuvieron a 10°C. Los productos amplificados se revelaron en un gel de agarosa al 2%.

### *Oxidación de $^{125}\text{I}$ a $^{125}\text{I}_2$*

La reacción se lleva a cabo a partir de Na<sup>125</sup>I (17.4 Ci/mg), en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.015%) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.0001 N) de acuerdo al método descrito por McAlpine (1945) y Thrall y colaboradores (1992), donde la eficiencia de oxidación es del 100%. La producción de I<sub>2</sub> se corroboró con el cambio de coloración de la solución (hacia rojo).

### *Análisis Histológico*

Los tejidos fijados en formalina 10% (SIGMA Chemical Co.) fueron deshidratados, embebidos en parafina, cortados en secciones de 5  $\mu$ M en un microtomo (Leica RM 2135), montados en laminillas y teñidos con hematoxilina-eosina (H&E). La evaluación histológica se hizo bajo un microscopio óptico (Leica DM 2500) y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital (Leica DFC420). El diagnóstico histológico de la lesión se realizó tomando como base la clasificación propuesta por Kaplan-Lefko y colaboradores (2003). En cada corte se determinó el tipo y la incidencia de cada tipo de lesión.

### *Cuantificación de T3 en suero mediante RIA*

Para determinar si la suplementación con la mezcla de yodo tuvo algún efecto en la función tiroidea, se cuantificaron los niveles circulantes de T3 en suero por radioinmunoanálisis (RIA). El ensayo contenía muestra o estándar de T3, suero hipotiroideo, anticuerpo anti T3 (Sigma 1:20000) y T3 radioactiva (5 pg/100  $\mu$ l [ $^{125}$ I] T3 en 3 mg/ml ANS). Esta mezcla se incubó a 4°C durante 24 horas. La separación del antígeno unido del libre se llevó a cabo agregando una solución de carbón activado-dextrán (0.5%). La solución se centrifugó a 2,500 rpm por 30 minutos a 4°C. Se cuantificó la radiactividad obtenida en la fracción unida (sobrenadante) y libre (botón). La curva estándar se construyó en un intervalo de 6.25 a 400 pg T3/dL. Los resultados se expresan como ng de T3/dL.

### *Evaluación de proliferación celular mediante inmunohistoquímica*

El efecto de una mezcla de yodo sobre la proliferación del epitelio prostático se evaluó utilizando como marcador la proteína PCNA, con modificaciones a la técnica descrita por Venkateswaran y colaboradores (2004) para próstata de ratón. Los tejidos fueron montados en laminillas pretratadas con silano 1%, se desparafinaron con xileno, se rehidrataron y se calentaron por 20 minutos en el horno de microondas (2 minutos a potencia máxima sin laminillas y dos ciclos 5 minutos a potencia media y 5 minutos a potencia baja) en buffer de citratos (pH 6). El bloqueo de peroxidasa endógena se realizó con la solución de peróxido de hidrógeno del kit DakoCytomation (K4011) (Dako, Glostrup, Denmark) por 20 minutos a temperatura ambiente, seguido por el bloqueo de unión inespecífica con albúmina sérica de bovino (Invitrogen Life Technologies, Baltimore, Md) por 30 minutos a 37 °C y una



incubación con el anticuerpo primario, PCNA (Santa Cruz Biotechnology) (1:50) por 12 horas a 4 °C. Las laminillas fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente con IgG anticonejo/IgG anticabra (Dako), acoplado a un polímero marcado con peroxidasa y revelado con una solución de cromógeno de 3,3'-diaminobenzidina (Dako). Finalmente cada laminilla se contrastó con hematoxilina, se deshidrató y se montó para su posterior análisis.

La tasa de proliferación se determinó como el número de células positivas a PCNA dividido por el total de células en tres campos seleccionados aleatoriamente a un aumento de x400. El recuento de las células se hizo utilizando un microscopio (Leica DM 2500) con el programa Leica Application Suite (Version 2.8.1), y las imágenes se adquirieron con una cámara digital (Leica DFC 420).

#### *Determinación de apoptosis mediante ELISA*

El efecto de la suplementación de una mezcla de yodo en la inducción de apoptosis se detectó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). En este ensayo se determina la presencia de mono y oligonucleosomas, los cuales son característicos de la inducción de muerte celular por apoptosis. Brevemente, el homogenado de tejido se incubó con un anticuerpo antihistonas, después con un anticuerpo anti-DNA acoplado a una peroxidasa y finalmente con un sustrato para peroxidasa (ABTS) para detectar la presencia de mono y oligonucleosomas. Los datos se normalizaron con respecto a la concentración de DNA. La absorbancia se corrigió con respecto al blanco (sin muestra y sin anticuerpo anti-DNA). El porcentaje de fragmentación del DNA se normalizó con respecto a la próstata de animales silvestres sin suplementación. Todas las mediciones estuvieron dentro del marco de lectura y la absorbancia fue al menos dos veces mayor que en el blanco.

#### *Cuantificación de mRNA de NIS, p53 y p21 mediante RT-qPCR*

La cuantificación de NIS, p53 y p21 en la próstata de ratón se analizó por PCR tiempo real cuantitativo. El RNA total se extrajo utilizando el kit SV Total Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), se disolvió en agua libre de RNAsas (50 µL) y se almacenó a -70°C. La cuantificación de RNA se realizó en un NanoDrop (Thermo

Fisher Scientific Inc) y la pureza se determinó con el cociente de absorbancia 260/280 nm ( $\approx$  promedio 2.0).

La generación de cDNA se realizó mediante la retrotranscripción de 2  $\mu$ g de RNA. El RNA se incubó con oligo dT (50  $\mu$ M) durante 5 minutos a 65°C. Enseguida se agregó buffer (Tris HCl 200 mM pH 8.4 y KCl 500 mM), DTT (0.1 M), RNasin (40 u/ $\mu$ L) y dNTPs (10 pmoles). Se incubó en el termociclador y al llegar a 42°C se agregó Superscript II (transcriptasa reversa) y se incubó por 1 hora. Después se incubó 20 minutos a 55°C para desactivar a la enzima.

La amplificación de cDNA se hizo por PCR tiempo real. En la Tabla 2 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos de NIS, p53, p21 y  $\beta$ -actina. Las condiciones del PCR fueron: 95°C por 10 minutos, 50 ciclos 95°C por 30 segundos, 54°C ó 60 °C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y finalmente una extensión final a 72°C por 10 minutos. La expresión de  $\beta$ -actina se utilizó como control de la calidad e integridad de RNA y un blanco sin cDNA se utilizó como control interno. Previo a la normalización con respecto a actina, los resultados se interpolaron en una curva estándar ( $10^2$ - $10^8$  copias). Como control de calidad se analizó la curva de disociación y el tamaño del producto mediante gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio para corroborar el tamaño del producto generado con respecto a un marcador comercial de DNA (1 Kb).

### **Análisis Estadístico**

Dependiendo del experimento, los datos fueron analizados con una prueba de T student, o bien con un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías ( $p \leq 0.05$ ). El análisis entre grupos se realizó con la prueba de Tukey o de Bonferroni, respectivamente ( $p \leq 0.05$ ). Los análisis se realizaron con la ayuda de un paquete estadístico (Prism 5, GraphPad Software, Inc, 1992-2003).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para PCR y PCR tiempo real.

<b>Gen</b>	<b>Secuencia GeneBank</b>	<b>Secuencia sentido/antisentido</b>	<b>Tamaño (bp)</b>	<b>Temperatura de alineamiento (°C)</b>
NIS	NM_053248	CCGGATCAACCTGATGGACT / CCTGAGGGTGCCACTGTAAG	381	54
p53	NM_001127233	TGAACCGCCGACCTATCCTTA/ GGCACAAACACGAACCTCAA	92	60
p21	NM_001111099	ATGTCCAATCCTGGTGATGT/ TGCAGCAGGGCAGAGGAAGT	302	60
SV40	**	CAGAGCAGAATTGTGGAGTGG / GGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTG	489-501	60.8-65
Tcrd	**	CAAATGTTGCTTGCTGGTG / GTCAGTCGAGTGCACAGTTT	200	57
β-actin	NM_031144	GTCCCAGTATGCCTCTGGTCGTAC / CCACGCTCGGTCAGGATCTTCATG	171	54

\*\* Los oligonucleótidos fueron diseñados por The Jackson Laboratory (USA).

## RESULTADOS

### Captura de yodo

#### *Curso temporal de la captura de $^{125}\text{I}^-$ y $^{125}\text{I}_2$ en la glándula tiroides y próstata normal*

La glándula tiroides se utilizó como control positivo de la captura de yodo. En la Figura 5 se muestra el curso temporal de la captura de yodo en la glándula tiroides de ratones silvestres de 12 y 24 semanas de edad. En ambos grupos la captura de  $^{125}\text{I}^-$  como la de  $^{125}\text{I}_2$  inicia en los primeros minutos, aumenta gradualmente, y alcanza niveles significativamente mayores a partir de los 60 minutos.

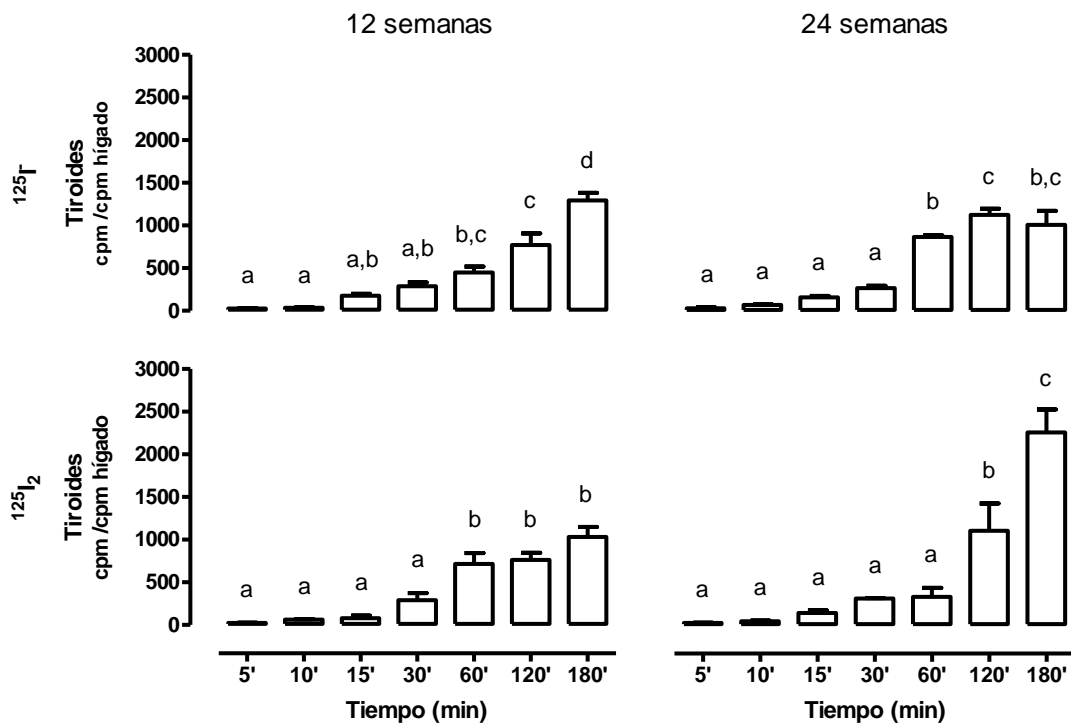


Figura 5. Curso temporal de la captura de  $^{125}\text{I}^-$  y  $^{125}\text{I}_2$  en glándula tiroides de ratones silvestres de 12 y 24 semanas de edad. Los ratones se sacrificaron a los tiempos señalados. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=3-6). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de una vía y una prueba Tukey *post hoc*. Letras distintas implican diferencias significativas (p<0.05).

En la Figura 6 se muestra la captura de  $^{125}\text{I}^-$  y  $^{125}\text{I}_2$  en la próstata de ratones de 12 y 24 semanas de edad. En ambos grupos la próstata capta yodo en los primeros 5 minutos. En el caso del  $^{125}\text{I}^-$  el nivel de captura inicial se mantiene a lo largo del estudio, mientras que con

el  $^{125}\text{I}_2$  se alcanzan valores significativamente más altos entre los 60 y 180 minutos. La próstata capta significativamente menos yodo que la glándula tiroides, sin embargo alcanza el nivel máximo de captura desde los primeros 10 minutos, mientras que en la glándula tiroides ocurre desde los 60 minutos.

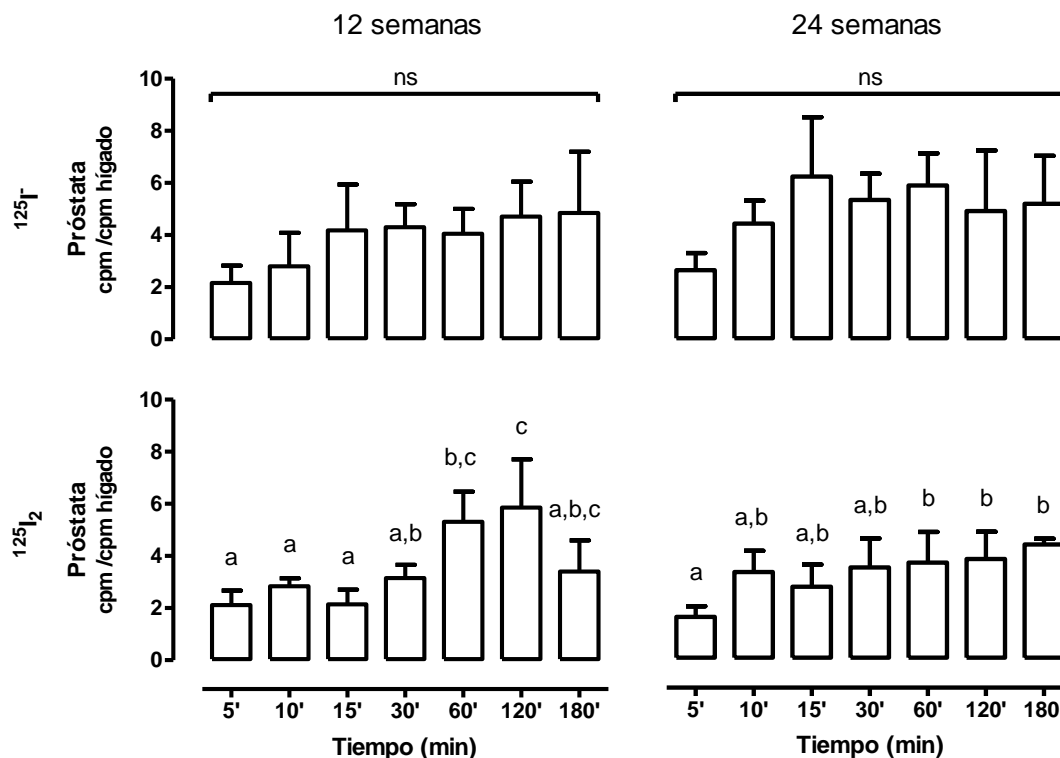


Figura 6. Curso temporal de la captura de  $^{125}\text{I}^-$  y  $^{125}\text{I}_2$  en la próstata de ratones silvestres de 12 y 24 semanas de edad. Los ratones se sacrificaron a los tiempos señalados. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=3-6). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de una vía y una prueba Tukey *post hoc*. Letras distintas implican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### *Efecto del $\text{ClO}_4^-$ en la captura de yodo en glándula tiroides, y en la próstata normal y tumoral*

Con el fin de determinar la participación de NIS en la captura de yodo, los ratones fueron previamente inyectados con  $\text{ClO}_4^-$  (inhibidor específico de NIS).

Los resultados de la Figura 7 muestran que la glándula tiroides de los ratones TRAMP capta  $^{125}\text{I}^-$  y  $^{125}\text{I}_2$ , en la misma magnitud que la de un ratón silvestre. En ambos grupos de

edad, el  $\text{ClO}_4^-$  inhibe en más de un 90 % la captura de  $^{125}\text{I}^-$  y  $^{125}\text{I}_2$  en la glándula tiroides de ratones silvestres y TRAMP.

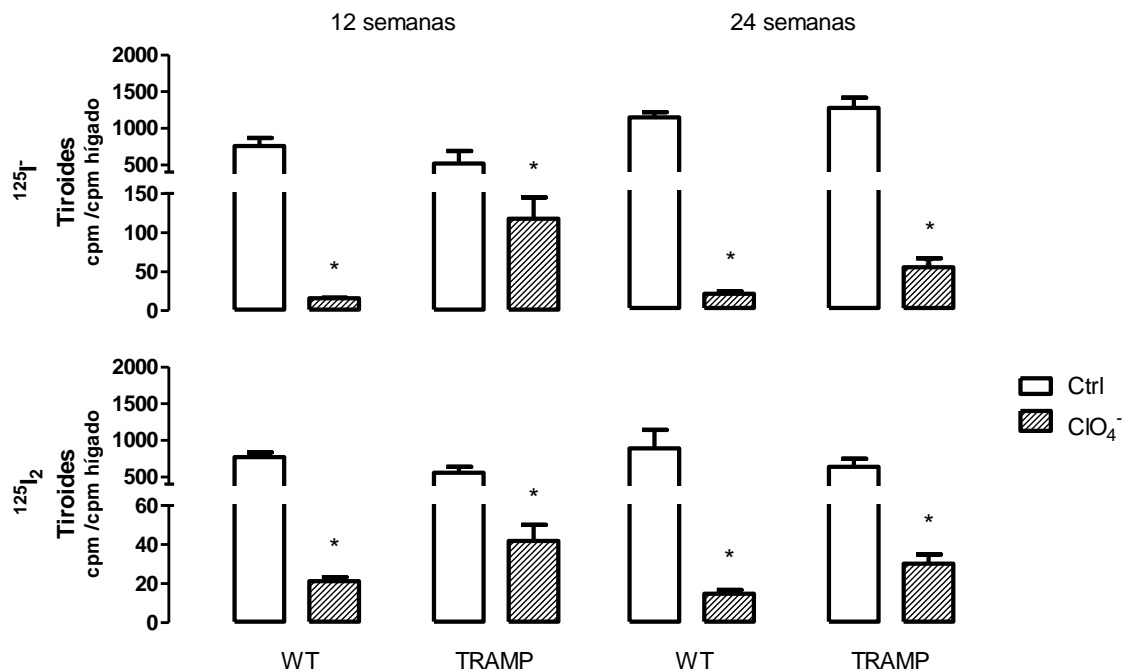


Figura 7. Efecto del perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ) en la captura de  $^{125}\text{I}^-$  y  $^{125}\text{I}_2$  en la glándula tiroides de ratones silvestres y TRAMP de 12 y 24 semanas de edad. El  $\text{ClO}_4^-$  se inyectó por vía i.p. y 60 minutos después se inyectaron 30  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}^-$  o  $^{125}\text{I}_2$  y los ratones se sacrificaron 120 minutos después. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=3-6). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de una vía y una prueba Tukey *post hoc*. Los asteriscos implican diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

La próstata de los ratones TRAMP capta  $^{125}\text{I}^-$  y  $^{125}\text{I}_2$  en la misma magnitud que la de un ratón silvestre. El  $\text{ClO}_4^-$  inhibe al menos un 60% la captura de  $^{125}\text{I}^-$  en ambos grupos de edad, y este efecto es igual en el ratón silvestre y en el ratón TRAMP. En el caso del  $^{125}\text{I}_2$  se observó una tendencia a disminuir en presencia de  $\text{ClO}_4^-$ , pero ésta no es significativa (Figura 8).

Es interesante notar que el efecto del  $\text{ClO}_4^-$  en la captura de  $^{125}\text{I}^-$  fue más evidente en la glándula tiroides que en la próstata. Sin embargo, este efecto es claramente distinto en el caso del  $^{125}\text{I}_2$ , ya que en la próstata no hay una inhibición significativa de la captura.

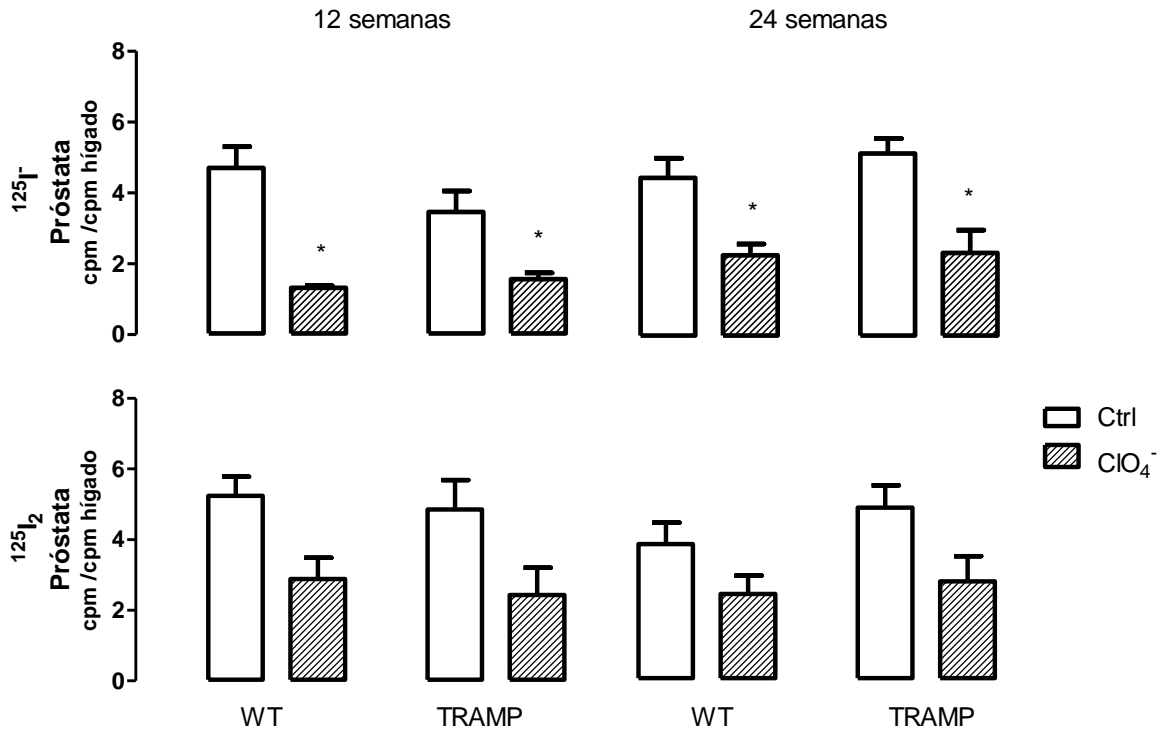


Figura 8. Efecto del perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ) en la captura de  $^{125}\text{I}^-$  y  $^{125}\text{I}_2$  en la próstata de ratones silvestres y TRAMP de 12 y 24 semanas de edad. El  $\text{ClO}_4^-$  se inyectó por vía i.p. y 60 minutos después se inyectaron 30  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}^-$  o  $^{125}\text{I}_2$  y los ratones se sacrificaron 120 minutos después. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=3-6). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de una vía y una prueba Tukey *post hoc*. Los asteriscos implican diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

#### Análisis de la expresión de NIS

Se determinó la expresión de NIS, con el fin de corroborar la participación de este transportador en la captura de  $^{125}\text{I}^-$  (Figura 9). La glándula tiroides y el hígado fueron empleados como control positivo y negativo de la expresión de NIS respectivamente.

Los niveles de expresión de NIS en la próstata son al menos dos veces mayores en los ratones TRAMP en comparación con los silvestres. La suplementación con yodo no modificó la expresión de NIS en los ratones silvestres, pero evitó la sobreexpresión en los ratones TRAMP.

En comparación con la glándula tiroides, la expresión de NIS en la próstata es 100 y 4 veces menor en los ratones silvestres y TRAMP respectivamente. En los ratones TRAMP suplementados con yodo, no se observó la sobreexpresión de NIS.

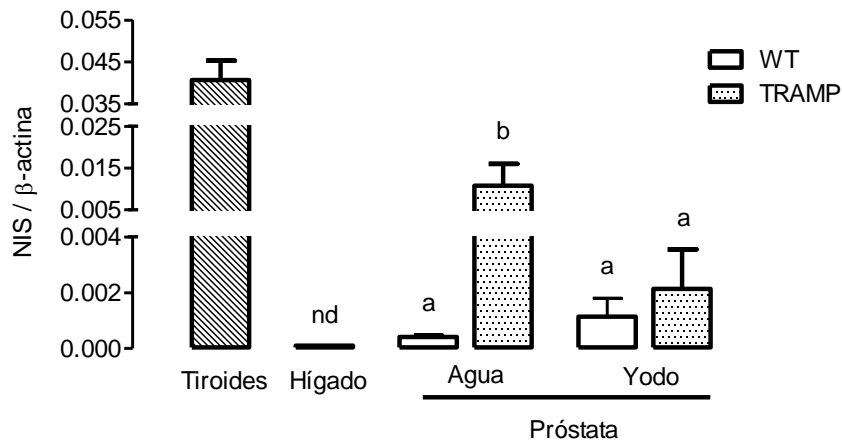


Figura 9. Efecto del yodo en la expresión de cotransportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS). El yodo fue suplementado durante 24 semanas a partir de la sexta semana de edad. La expresión del mRNA de NIS se analizó por qRT-PCR. La glándula tiroides y el hígado se emplearon como control positivo y negativo respectivamente. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión de  $\beta$ -actina, un gen constitutivo y se expresan como media  $\pm$  SEM (n=4-6). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías y una prueba Bonferroni *post hoc*. Letras distintas implican diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ). n.d. no detectado.

## Efecto del yodo en la prevención del cáncer prostático

### Consumo de yodo

Como se describió previamente, el yodo se administró en el agua para beber a una concentración de 0.025%. El consumo diario de agua y yodo se registró durante una semana. Los resultados mostraron que los ratones consumen en promedio 5 ml de agua o yodo por día. El consumo total de yodo equivale a 0.187 mg/ día, de los cuales 0.062 mg son de  $\text{I}_2$  y 0.125 mg de  $\text{I}^-$  (Figura 10).



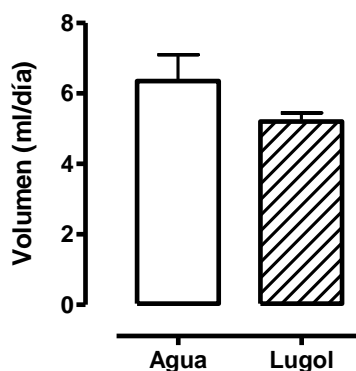


Figura 10. Consumo diario de agua y yodo por ratón. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=4-9). El análisis estadístico se realizó con una prueba t de student no pareada. No se encontraron diferencias significativas.

### *Peso corporal*

El peso corporal se registró cada cuatro semanas. Los resultados de la Figura 11 muestran que la suplementación con yodo no modifica la ganancia de peso en los ratones silvestres, ni en los ratones TRAMP.

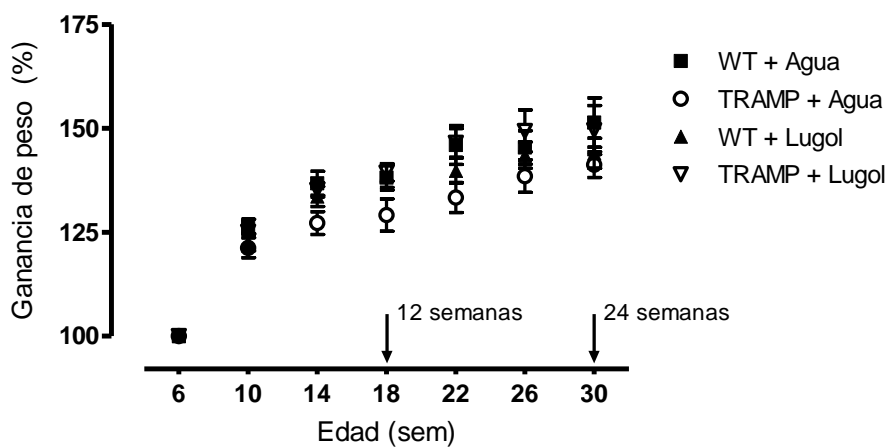


Figura 11. Efecto del yodo en la ganancia de peso corporal de ratones silvestres y TRAMP. Los animales fueron suplementados con yodo por un periodo de 12 ó 24 semanas, a partir de la sexta semana de edad (las flechas indican la edad al término). Los datos se expresan como porcentaje de ganancia de peso corporal con respecto al peso inicial. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=15-24). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de una vía y una prueba Tukey *post hoc*. No hay diferencias significativas.

### Niveles circulantes de T3

Con el fin de determinar si la suplementación con yodo a largo plazo modificó la función tiroidea, se cuantificaron los niveles circulantes de T3 (Figura 12). El análisis muestra que la administración de yodo por 12 semanas no modifica los niveles de esta hormona en ninguno de los grupos. Mientras que la administración por 24 semanas aumenta modesta, pero significativamente los niveles de T3 de los ratones TRAMP. Sin embargo, todos los valores se encuentran dentro de los niveles de reportados de T3 para un ratón eutiroides (50-80 ng/dL) (Endo y Kobayashi, 2010; Fröhlich *et al.*, 2011)

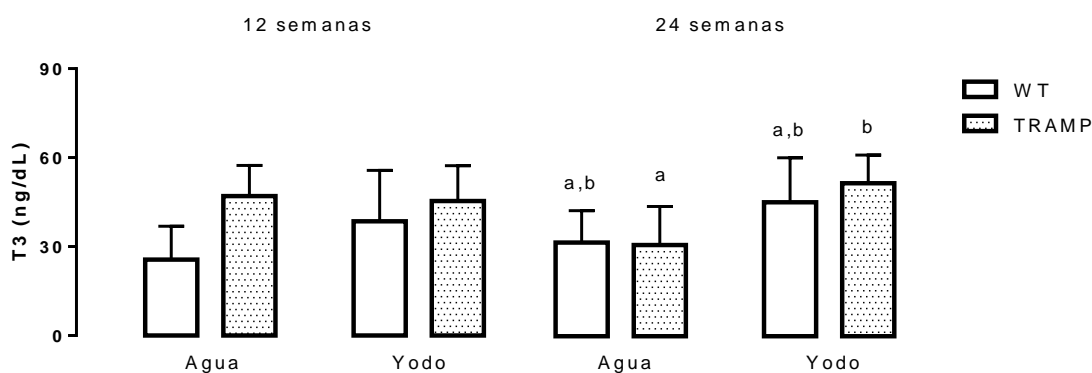


Figura 12. Efecto del yodo en los niveles de T3. Los ratones silvestres y TRAMP fueron suplementados por 12 ó 24 semanas, a partir de la sexta semana de edad. Los niveles de T3 se cuantificaron en suero mediante RIA. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=4-5). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías y una prueba Bonferroni *post hoc*. Letras distintas implican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### Peso corporal y del tracto genitourinario (GUT)

El peso corporal y el del GUT se registraron al final del experimento. La suplementación con yodo no modifica el peso corporal de los ratones silvestres ni de los TRAMP, independientemente de la duración del tratamiento (Figura 13 A). En cuanto al peso del GUT, este fue normalizado con respecto al peso corporal. Como era de esperarse, e independientemente de la duración del tratamiento, el peso del GUT de los animales TRAMP es significativamente más pesado que el de los animales silvestres. Sin embargo, la suplementación con yodo no modifica el peso del GUT con respecto a sus contrapartes no tratadas (Figura 13 B).

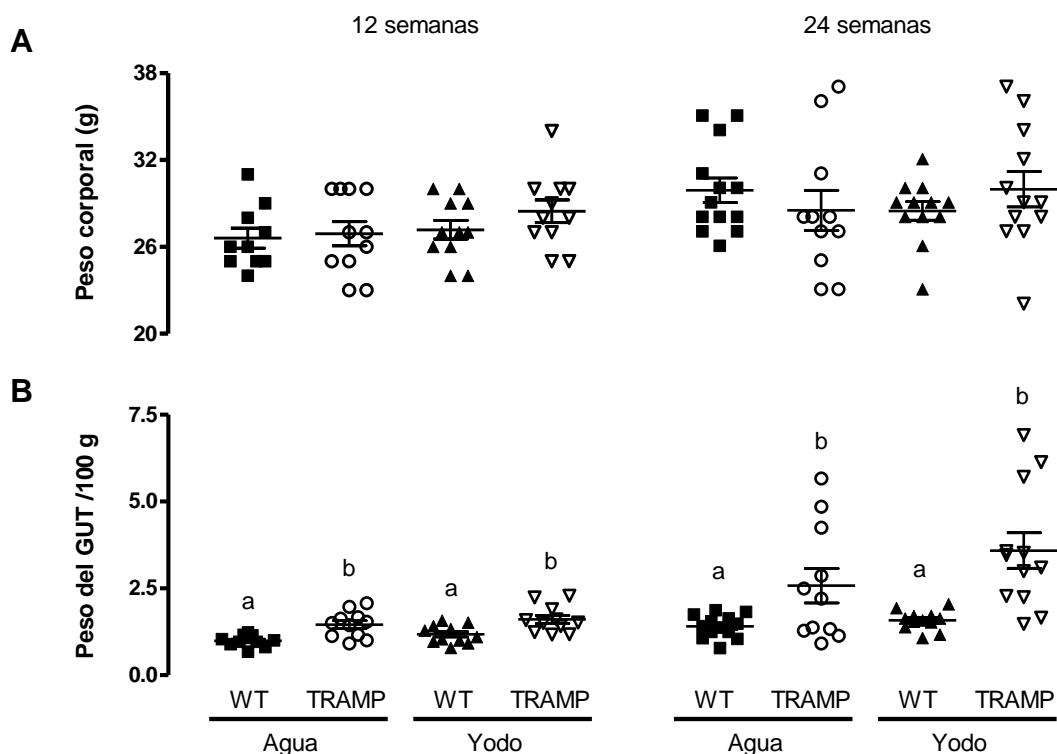


Figura 13. Efecto del yodo en el peso corporal y el peso del tracto genitourinario (GUT). Los ratones silvestres y TRAMP fueron suplementados con yodo por un periodo de 12 ó 24 semanas, a partir de la sexta semana de edad. El peso del GUT fue normalizado con respecto al peso corporal. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=10-13). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías y una prueba Bonferroni *post hoc*. Letras distintas implican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### Análisis Histopatológico

El análisis histopatológico se hizo de acuerdo a los criterios propuestos por Kaplan-Lefko y colaboradores (2003). Para definir el grado de lesión (neoplasia intraepitelial prostática [PIN] *versus* cáncer bien diferenciado [WD]) se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

PIN: se caracteriza por presentar aglomeramiento epitelial, núcleos hipercromáticos y elongados, estratificación nuclear, proyecciones micropapilares, estructuras cribiformes, incremento de mitosis y apoptosis.

Cáncer bien diferenciado: se caracteriza por la presencia de núcleos redondeados, engrosamiento del estroma y un incremento en mitosis y apoptosis asociadas con inflamación (presencia de leucocitos).

El estadio del tumor se definió considerando el grado de lesión más severo observado en los cortes. En la Figura 14 se muestran imágenes representativas de cada grupo. Como era de esperarse, el epitelio de los animales silvestres es normal. En los ratones TRAMP, con o sin tratamiento (por 12 ó 24 semanas), se observó una lesión tumoral tipo WD.

Además del diagnóstico histopatológico, se analizó la frecuencia del grado de lesión (PIN y WD). En la Figura 14 se muestra que en los ratones WT todos los acinos mostraron una citoarquitectura normal. En el caso de los ratones TRAMP, el porcentaje de acinos con lesión (PIN y WD) fue del 56%, *versus* 50% en el grupo que consumió yodo por 12 semanas. Mientras que en el grupo de 24 semanas, el porcentaje de acinos con lesión fue del 51% en los animales control y del 57% en los animales que consumieron yodo. Cabe señalar que en ninguno de los dos casos se encontraron diferencias significativas con respecto al control.

#### *Efecto del yodo en la tasa de proliferación*

El efecto antiproliferativo de la suplementación con yodo en el desarrollo de cáncer, se evaluó analizando la presencia de PCNA, como indicador de proliferación celular. En la Figura 15 se muestran cortes representativos de cada grupo, observándose células positivas en todos los grupos. Los resultados muestran que los animales TRAMP presentaron un incremento en la tasa de proliferación con respecto al control, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en los ratones TRAMP que consumieron yodo *versus* los animales sin tratamiento.

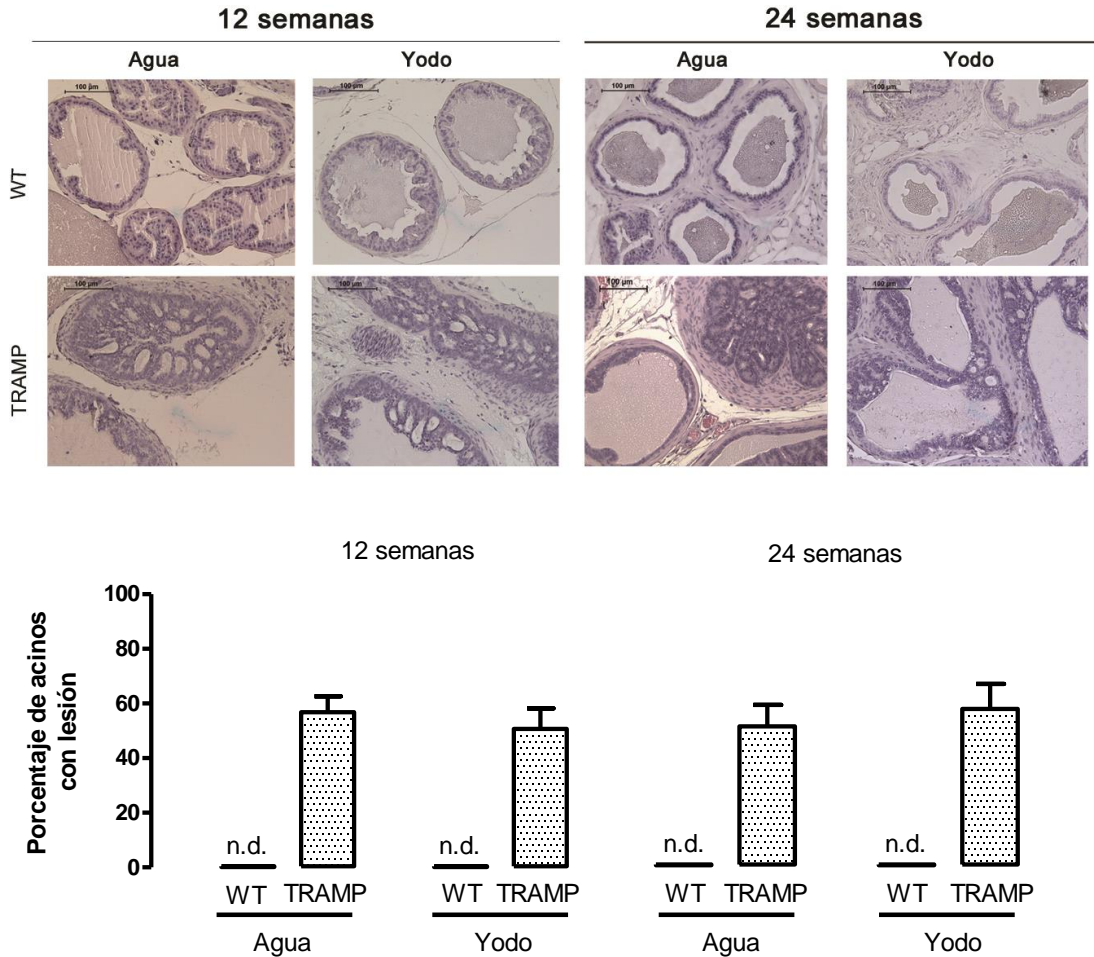


Figura 14. Efecto del yodo en la incidencia de lesiones patológicas en la próstata de ratón. Se utilizaron ratones WT y TRAMP los cuales consumieron agua o yodo durante un periodo de 12 ó 24 semanas. Al momento del sacrificio se extrajo la próstata completa para su análisis histopatológico. Los ratones WT no presentan ningún tipo de lesión, mientras que los ratones TRAMP tienen un tumor bien diferenciado (WD). Se muestran imágenes representativas de secciones histológicas teñidas con H&E, (magnificación 20x). Además se muestran los porcentajes de lesión presentes (normal y lesión patológica [PIN y WD]). Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=4-6). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías y una prueba Bonferroni *post hoc*. No se encontraron diferencias significativas (n.d.).

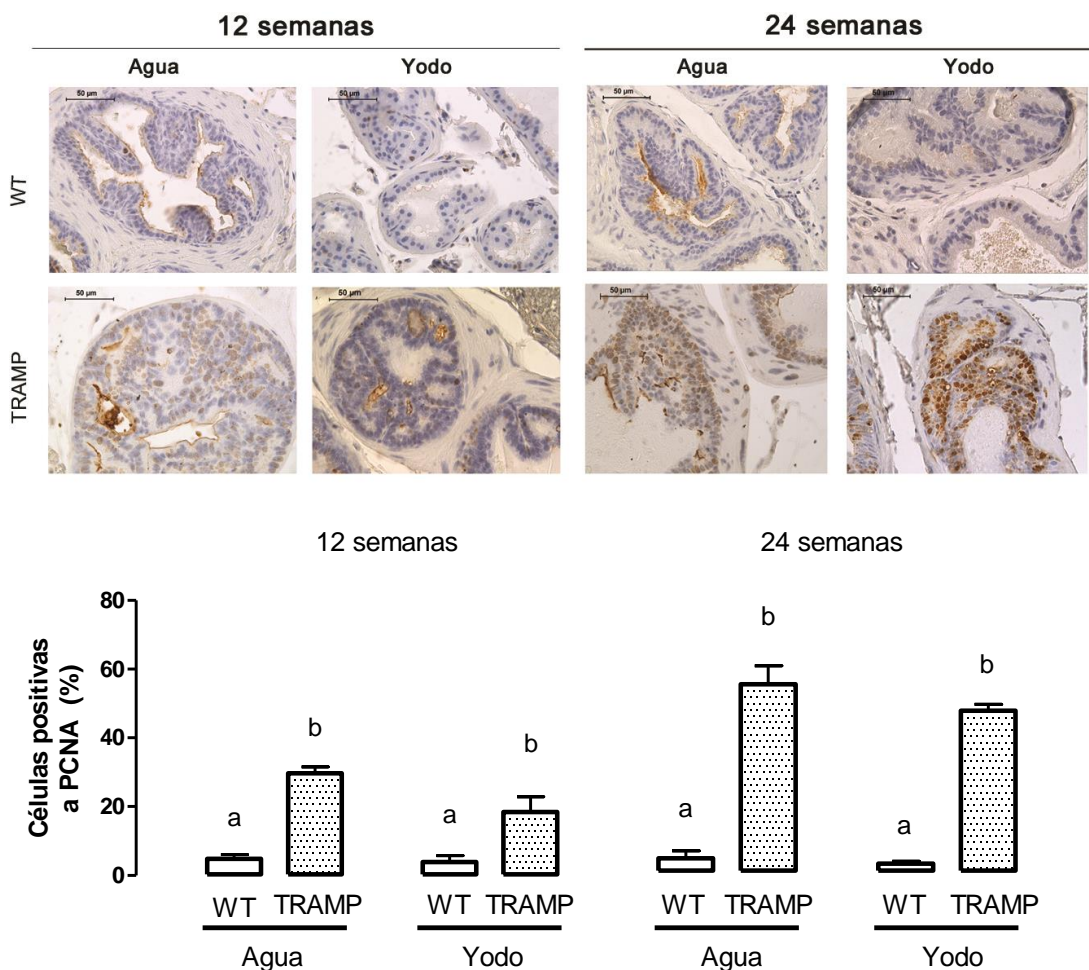


Figura 15. Efecto del yodo en la tasa de proliferación de la próstata de ratón. Se utilizaron ratones WT y TRAMP los cuales consumieron agua o yodo durante un periodo de 12 ó 24 semanas. Se muestran imágenes representativas de cada grupo (magnificación 40x) y el porcentaje de células positivas a PCNA con respecto al total de células por campo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=4-6). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías y una prueba Bonferroni *post hoc*. Letras distintas implican diferencias significativas.

La suplementación con yodo por 24 semanas, incrementó significativamente la expresión del mRNA de p53 en los animales TRAMP. Mientras que en p21 no se observa ningún efecto (Figura 16).

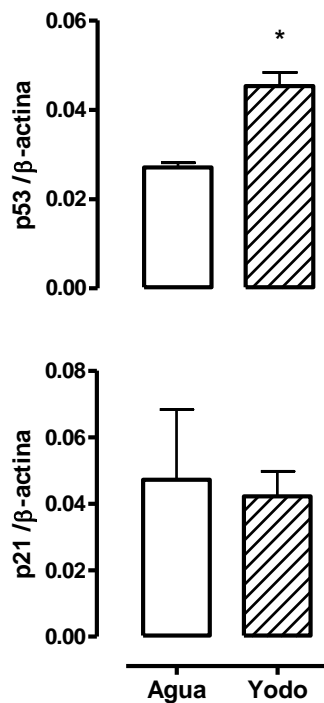


Figura 16. Efecto del yodo en la expresión del mRNA de p53 y p21 en la próstata tumoral. Se utilizaron ratones WT y TRAMP los cuales consumieron agua o yodo durante un periodo de 24 semanas. La expresión de los genes se analizó mediante RT-qPCR. Los datos se normalizaron con respecto a la expresión de  $\beta$ -actina, un gen constitutivo y se expresan como media  $\pm$  SEM (n=3). El análisis estadístico se realizó con una prueba t de Student. Los asteriscos implican diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

### *Apoptosis*

En la Figura 17 se muestra el porcentaje de fragmentos de DNA como indicador de apoptosis, en ratones de 24 semanas. La suplementación con yodo no induce apoptosis ni en los animales silvestres ni en los TRAMP.

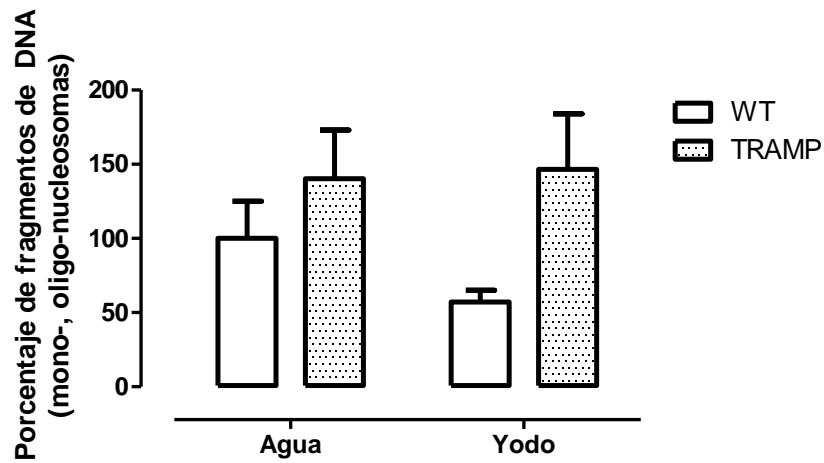


Figura 17. Efecto del yodo en la inducción apoptosis (porcentaje de fragmentos de DNA) en la próstata de ratón. Se utilizaron ratones WT y TRAMP los cuales consumieron agua o yodo durante un periodo de 24 semanas. El porcentaje de mono y oligo-nucleosomas se determinó mediante un ensayo de ELISA. Los datos se normalizaron con respecto a la concentración de DNA. El porcentaje de cambio de apoptosis se calculó considerando la apoptosis de los animales WT como 100%. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=4-6). El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de dos vías y una prueba Bonferroni *post hoc*. No se encontraron diferencias significativas.



## DISCUSIÓN

### Captura de Yodo

En este estudio se muestra por primera vez que, independientemente de la edad, la próstata normal (WT) y tumoral (TRAMP) de ratón capta yodo en dos formas químicas: como yoduro ( $I^-$ ) y en su forma molecular ( $I_2$ ). Aunque en términos cuantitativos y de temporalidad, las cinéticas de la captura de yoduro en la glándula tiroides y en la próstata son diferentes, los estudios farmacológicos y moleculares indican que NIS podría estar involucrado en la captura de yoduro en ambos tejidos. En la glándula tiroides se observó una captura de yodo, 200 veces mayor a la de la próstata, lo cual es consistente con el hecho de que la glándula tiroides expresa niveles elevados de NIS, característica fundamental para la biosíntesis de hormonas tiroideas (Dohán y Carrasco, 2003).

La inhibición de la captura de  $I^-$  por  $ClO_4^-$  en la próstata normal y tumoral, indica que la captura de  $I^-$  depende de NIS. Este hallazgo concuerda con la bien conocida expresión de NIS (RT-PCR e inmunohistoquímica) en el tejido prostático normal y tumoral, de origen humano y murino (Spitzweg *et al.*, 1998; Perron *et al.*, 2001; Wapnir *et al.*, 2003; Navarra *et al.*, 2010). Recientemente, Aranda y colaboradores (2013) reportaron que células no tumorales de próstata (RWPE-1) captan 2 veces más  $I^-$  que células cancerosas (LNCaP). Además, demostró que las células RWPE-1, pero no las LNCaP expresan NIS. Se ha reportado que en las células tumorales se reduce o incluso se pierde la capacidad de captar  $I^-$  y la expresión de NIS se ve alterada, sugiriendo que la transformación maligna modifica la expresión de NIS (Wapnir *et al.*, 2003; Kogai *et al.*, 2006; Altorjay *et al.*, 2007). A diferencia de las líneas celulares, en el modelo *in vivo* la próstata tumoral capta  $I^-$  en la misma magnitud que la próstata normal. Este hallazgo resulta muy interesante, pues significa que el tejido prostático no pierde la capacidad de captar  $I^-$  con el desarrollo del tumor.

En la glándula tiroides, el pretratamiento con  $ClO_4^-$  inhibe significativamente la captura de  $I_2$ . Esta inhibición parcial se ha descrito previamente en glándula tiroides y en la glándula mamaria, y puede corresponder más bien a la inhibición de la captura de  $I^-$  generada en el organismo por la reducción de  $I_2$ . Existen evidencias que, mientras que la conversión de  $I^-$  a  $I_2$  requiere un mecanismo enzimático (peroxidasa), la conversión de  $I_2$  a

I<sup>-</sup> parece no estar mediada por mecanismos enzimáticos y un ambiente reductor podría favorecer esta conversión (Thrall *et al.*, 1992; Anguiano *et al.*, 2007).

A diferencia de la glándula tiroides, en la próstata el ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> no inhibió la captura de I<sub>2</sub>. La temporalidad y la captura del I<sub>2</sub> fue semejante a la del I<sup>-</sup>, sin embargo el análisis farmacológico indica que NIS no participa en la captura de I<sub>2</sub> (insensibilidad al ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) en la próstata normal ni en la tumoral. Aunque se desconoce el mecanismo involucrado en la captura de I<sub>2</sub> en la próstata, estudios previos de nuestro laboratorio en la glándula mamaria sugieren que esta forma química podría ser internalizada por un mecanismo de difusión facilitada (Arroyo-Helguera *et al.*, 2006).

Aunque a la fecha la relevancia funcional de yodo en la próstata es desconocida, diversos estudios muestran efectos antitumorales del yodo en patologías prostáticas (Aceves y Anguiano, 2009; Aranda *et al.*, 2013).

### **Efecto del yodo en la prevención del cáncer prostático**

Los datos muestran que la suplementación con yodo por corto (12 semanas) y largo plazo (24 semanas), no tuvo ningún efecto protector en la evolución del cáncer prostático. No modificó el peso corporal, el peso del GUT, no previno el desarrollo del cáncer, la proliferación celular (PCNA, p53 y p21) ni la apoptosis (mono- y oligo-nucleosomas). Esta insensibilidad de los ratones TRAMP al tratamiento con yodo contrasta con estudios previos de nuestro laboratorio, donde la suplementación con I<sup>-</sup> o I<sub>2</sub> a ratas con hiperplasia prostática (inducida por hormonas), disminuye significativamente el contenido de DNA (Aceves and Anguiano, 2009). En células de cáncer de próstata humano, el tratamiento con I<sup>-</sup> o I<sub>2</sub>, ejerce efectos antiproliferativos y apoptóticos (vía Bax caspasas). Y en un modelo de ratones desnudos con xenotrasplantes de células DU145, la suplementación con una combinación de I<sub>2</sub>+I<sup>-</sup> inhibe significativamente el crecimiento del tumor (Aranda *et al.*, 2013). Estos efectos podrían explicarse por la acción independiente y combinada de las dos formas de yodo, pues se ha descrito la presencia de una peroxidasa en el epitelio prostático (mieloperoxidasa), la cual podría participar en la oxidación del I<sup>-</sup> (Roumeguère *et al.*, 2012).

La falta de respuesta del modelo TRAMP ante el tratamiento del yodo no está asociada con la forma química administrada, con la dosis o vía de administración del yodo ni con el origen de las células prostáticas (roedor *versus* humano). La dosis de yodo administrada en este estudio es al menos 20 veces mayor a la ingesta diaria recomendada. Sin embargo esta dosis no tuvo ningún efecto en la función tiroidea (T3) y equivale a la ingesta de yodo que consume la población japonesa (Hoption Cann *et al.*, 2007). Por el tanto, esta poca sensibilidad del yodo pareciera estar asociada al mecanismo mediante el cual se desarrolla el cáncer en el modelo TRAMP. Estudios en células de cáncer de mama (MCF7) muestran un incremento significativo en la expresión de p53, y consecuentemente de p21 y Bax, después del tratamiento con yodo (Shrivastava *et al.*, 2006; Arroyo-Helguera *et al.*, 2008). En el presente estudio se incrementó la expresión de p53 después de la suplementación con yodo, pero no se vio reflejado en la expresión de p21. La inhibición funcional de p53 en el modelo TRAMP es una consecuencia de la expresión de la proteína Tag, la cual inactiva directamente a p53 y a Rb. Por lo que la elevada expresión de p53 por yodo no es suficiente para ejercer el efecto antineoplásico.

Existen controversias con respecto a la sensibilidad de diferentes agentes quimioterapéuticos en el modelo TRAMP; mientras que algunos estudios han validado su eficacia (Nguewa y Calvo, 2010), otros sugieren que es un modelo agresivo (tumor difuso, invasión a las vesículas seminales y una rápida transición de poco a muy invasivo) (Gupta *et al.*, 2004). Algunas drogas antiinflamatorias (celecoxib) han mostrado prevenir la aparición de lesiones tempranas (PIN), pero no la transición a adenocarcinoma. Esta protección temprana se ha explicado por la activación coordinada de vías dependientes (p21/ Bax) e independientes (inhibición de NF-kB, ciclooxigenasa-2, P13K/AKT/p27) de p53 (Narayanan *et al.*, 2004). Incluso en estudios usando diferentes compuestos de la dieta o condiciones alimenticias (bajo en grasa, restricción energética), cuyos mecanismos de acción son independientes de p53 (receptores a los andrógenos, NF-kB, PI3K/AKT, entre otros), los efectos mostrados son modestos (Bonorden *et al.*, 2012; Berman-Booty *et al.*, 2013).

Por otro lado, existe evidencia de que el yodo puede actuar a nivel de la progresión del cáncer, previniendo o retrasando la adquisición de mecanismo de invasión. En modelos de

cáncer de mama, la suplementación con yodo inhibe la expresión de VEGF y uPA (Aceves *et al.*, 2009; Mendieta *et al.*, 2011). En este estudio ninguno de los ratones TRAMP (control o suplementados) desarrollaron un fenotipo desdiferenciado a las 18 ó a las 30 semanas. Sin embargo, se ha sugerido que el cáncer de próstata en el modelo TRAMP puede progresar a un fenotipo neuroendócrino e invasivo (Huss *et al.*, 2007; Chiaverotti *et al.*, 2008). Sería interesante analizar el papel del yodo en la adquisición del fenotipo neuroendócrino, pues estudios recientes en células de neuroblastoma, muestran que el tratamiento con I<sub>2</sub> induce efectos antiproliferativos y sensibiliza a las células a los efectos diferenciadores del ácido retinóico (Rösner *et al.*, 2010; Godoy-García *et al.*, 2013).

En diversos tejidos los efectos antitumorales del yodo han sido explicados por la formación de un lípido yodado, la 6-IL (Aceves *et al.*, 2013). Aunque no se ha identificado la formación endógena de 6-IL en el epitelio prostático, el tratamiento con 6-IL a células humanas de cáncer prostático, mimetiza los efectos antiproliferativos y apoptóticos del I<sub>2</sub> (Aranda *et al.*, 2013). Dado que en el ratón TRAMP se han descrito una serie de alteraciones en las enzimas involucradas en el metabolismo del AA, es probable que con un aporte suficiente de I<sub>2</sub> se pudiera estar formando este yodolípido (Shappell *et al.*, 2003). En nuestro estudio no se descarta la formación de 6-IL en la próstata del ratón TRAMP, sin embargo la continua y exacerbada expresión de la proteína Tag y la consecuente inhibición de p53 y Rb podría estar opacando este efecto.

En resumen, nuestros datos muestran que aunque la próstata es capaz de captar tanto I<sup>-</sup> como I<sub>2</sub>, la suplementación con una combinación de estas dos formas químicas de yodo no modifica la fisiopatología de la próstata. La incapacidad de yodo para inducir arresto celular o apoptosis en el modelo TRAMP, podría explicarse por la continua y exacerbada expresión de la proteína Tag (inhibiendo p53 y Rb). Para entender mejor los efectos del yodo en el desarrollo del cáncer de próstata, serán necesarios estudios en modelos menos agresivos, cuyo mecanismo de acción no involucre la inactivación directa de p53. En la figura 18 se muestra el posible modelo del mecanismo de acción de yodo en la próstata.

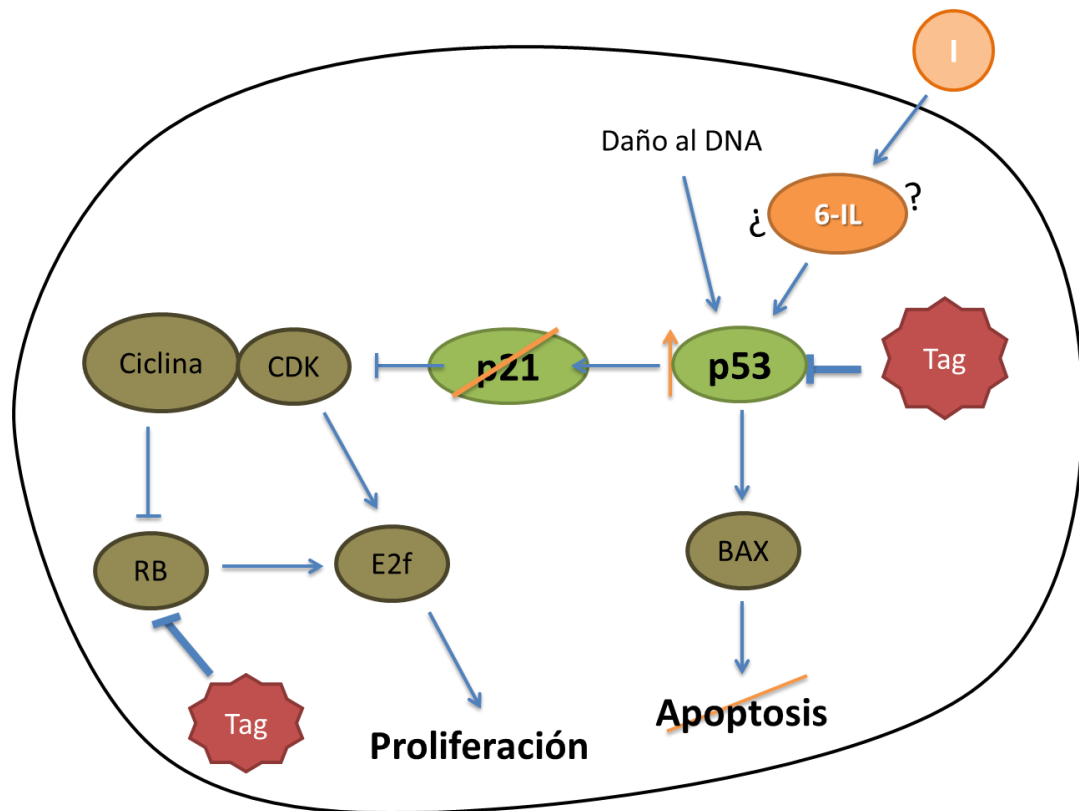


Figura 18. Posible modelo del mecanismo de acción del yodo en la próstata del ratón TRAMP. La próstata tumoral capta yoduro y yodo molecular, y potencialmente es capaz de generar lípidos yodados, como la 6-yodolactona (6-IL). En este modelo la 6-IL podría inducir la transcripción de p53, sin embargo esto no se vio reflejado en la expresión de p21 (gen blanco de p53). Es probable que el aumento en la expresión de p53 no sea suficiente para reducir la proliferación celular e inducir apoptosis. Esto puede ser debido a la continua y exacerbada expresión de la oncoproteína Tag (inhibidor de p53 y Rb), característica del modelo TRAMP.

## CONCLUSIONES

- 1- La próstata normal y tumoral capta yodo en forma de  $I^-$  y  $I_2$ .
- 2- En ambos tipos de epitelio la captura de  $I^-$  depende de NIS, mientras que la de  $I_2$  es independiente de este transportador.
- 3- La suplementación con ambas formas químicas de yodo estimuló la expresión de p53, pero no de p21, y no previno el desarrollo del proceso canceroso.
- 4- En este estudio el uso del ratón TRAMP no permitió evaluar el efecto antineoplásico del yodo, debido a que este modelo se contrapone al mecanismo de acción del yodo (vía p53).

## **PERSPECTIVAS**

Este trabajo sustenta bases para continuar el análisis sobre la participación del yodo en la fisiopatología prostática. Se demostró que la próstata normal y tumoral capta yodo en distintas formas químicas; sin embargo se desconocen aspectos básicos del metabolismo del yodo en el tejido prostático. Se requiere profundizar en los mecanismos de captura del yodo molecular; y comprender como estas formas químicas ( $I^-$  o  $I_2$ ), pueden ser biotransformadas (reducidas u oxidadas) en condiciones fisiológicas y patológicas.

Se mostró que la suplementación oral con yodo aumenta la expresión de p53, pero no de p21; y tampoco previno la aparición de tumores en la próstata del ratón TRAMP. Los efectos del yodo sobre la expresión génica han sido previamente explicados a través de dar lugar a la formación de 6-IL, el cual actúa como ligando de los receptores nucleares PPAR. Se requiere analizar si efectivamente en presencia de las diferentes formas químicas de yodo, el epitelio prostático es capaz de generar no sólo 6-IL, sino también otros lípidos yodados de potencial interés biológico.

El nulo efecto antineoplásico del yodo observado en el modelo TRAMP, fue explicado a través de la inhibición constitutiva de las vías p53-p21/p53-BAX mediadas por las oncoproteínas Tag. Esta hipótesis requiere ser corroborada en un modelo in vivo de cáncer prostático que no involucre la inactivación de p53. Un modelo útil serían el uso de xenotrasplantes de células cancerosas humanas en ratones inmunosuprimidos. De observarse un efecto antineoplásico del yodo, valdría la pena evaluar el efecto del yodo en combinación con las estrategias clínicas empleadas para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata.

## REFERENCIAS

- Aceves C y Anguiano B. 2009. Is iodine an antioxidant and antiproliferative agent for the mammary and prostate glands? En: *Comprehensive Handbook of Iodine. Nutritional Endocrine and Pathological Aspects*. Preedy VR, Burrow GN, Watson RR (Ed). Academic Press. 249-257.
- Aceves C, Anguiano B, Delgado G. The extrathyronine actions of iodine as antioxidant, apoptotic, and differentiation factor in various tissues. *Thyroid*. 2013; 23:938-946.
- Alfaro Y, Delgado G, Cárabez A, Anguiano B, Aceves C. Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Mol Cancer*. 2013; 12:45.
- Altorjay A, Dohán O, Szilágyi A, Paroder M, Wapnir IL, Carrasco N. Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) is markedly decreased or absent in gastric cancer and intestinal metaplastic mucosa of Barrett esophagus. *BMC Cancer*. 2007; 7:5.
- Anguiano B, García-Solís P, Delgado G, Aceves Velasco 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, Sosa S, Delgado G, Aceves C, Anguiano B. Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in differentiated and undifferentiated human prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2013; 73:31-41.
- Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat 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. *Endocr Relat Cancer*. 2008; 15:1003-1011.
- Berman-Booty LD, Chu PC, Thomas-Ahner JM, Bolon B, Wang D, Yang T, Clinton SK, Kulp SK, Chen CS. Suppression of prostate epithelial proliferation and intraprostatic progrowth signaling in transgenic mice by a new energy restriction-mimetic agent. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013; 6:232-241.
- Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H and Chen YQ. Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 2005; 280:36442–36451.
- Blackwood JK, Williamson SC, Greaves LC, Wilson L, Rigas AC, Sandher R, Pickard RS, Robson CN, Turnbull DM, Taylor RW, Heer R. In situ lineage tracking of human prostatic epithelial stem cell fate reveals a common clonal origin for basal and luminal cells. *J Pathol*. 2011; 225:181-188.
- Bonorden MJ, Grossmann ME, Ewing SA, Rogozina OP, Ray A, Nkhata KJ, Liao DJ, Grande JP, Cleary MP. Growth and progression of TRAMP prostate tumors in relationship to diet and obesity. *Prostate Cancer*. 2012. En prensa.



- Bostwick DG, Qian J, Hossain D. Non-neoplastic diseases of the prostate. En David G. Bostwick, Liang Cheng. 2008. Urologic surgical pathology. Elsevier Health Sciences. China. 381-442.
- Cann SA, van Netten JP, Glover DW, van Netten C. Iodide accumulation in extrathyroidal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:821-822.
- Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1154:65-82.
- Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol.* 2012; 61:1079-1092.
- Chiaverotti T, Couto SS, Donjacour A, Mao JH, Nagase H, Cardiff RD, Cunha GR, Balmain A. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *Am J Pathol.* 2008; 172:236-246.
- Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med.* 2002; 43:1188-1200.
- Cramer SD. 2007. Prostate Cancer. Infobase Publishing. USA.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev.* 1987; 8:338-362.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 92:221-236.
- Dohán O, Carrasco N. Advances in Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 213:59-70.
- Dohán O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N. The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:20250-20255.
- Dunn JT. What's happening to our iodine? *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:3398-3400.
- Endo T, Kobayashi T. Runx2 deficiency in mice causes decreased thyroglobulin expression and hypothyroidism. *Mol Endocrinol.* 2010; 24:1267-1273.
- Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem.* 1997; 272:27230-27238.
- Eskin BA, Grotkowski CE, Connolly CP, Ghent WR. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biol Trace Elem Res.* 1995; 49:9-19.
- Frank SB, Miranti CK. Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Front Oncol.* 2013; 3:1-23.
- Fröhlich HI, Boini KM, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Ureche ON, Föllner M, Eichenmüller M, Shumilina E, Pathare G, Singh AK, Seidler U, Pfeifer KE, Lang F.

- Hypothyroidism of gene-targeted mice lacking Kcnq1. *Pflugers Arch.* 2011 Jan; 461:45-52.
- Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tobinaga J, Wada M, Morita T, Yamada F, Tsukamura K, Oiwa M, Kikumori T, Narita T, Takagi H. Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *J Surg Oncol.* 1996; 61:209-213.
- Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. Global cancer facts and figures 2007. Atlanta, GA; American Cancer Society 2007.
- Garcia-Solís P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guzman RC, Nandi S, Diaz-Munoz M, Vazquez- Martinez O, Aceves C. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I<sub>2</sub>) but not by iodide (I<sup>-</sup>) treatment Evidence that I<sub>2</sub> 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. *Cancer Journal of Surgery.* 1993; 36: 453-460.
- Gingrich JR, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1999; 2:70-75.
- Giovannucci E, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer.* 2007; 121:1571-1578.
- GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. 2010 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; [cited 01 Jul 2013]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- Godoy-García L, Nava-Villalba M, Delgado G, Aceves C. Molecular iodine adjuvancy in the antineoplastic effect of retinoic acid on neuroblastoma cells [abstract]. En: 17th European Cancer Congress; 2013 Sept 27-30; Amsterdam, The Netherlands: ECCO; 2013. Abstract nr 1648.
- Gottardi W. 2001. Iodine and Iodine compounds. En: Block S (Ed). *Disinfection, sterilization and preservation.* Fifth Edition. Lippicott Williams & Wilkins. Philadelphia PA. USA.
- Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ, Rosen JM. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:3439-3443.
- Gupta S, Adhami VM, Subbarayan M, MacLennan GT, Lewin JS, Hafeli UO, Fu P, Mukhtar H. Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cancer Res.* 2004; 64: 3334-3343.
- Haas GP, Sakr WA. Epidemiology of prostate cancer. *CA Cancer J Clin.* 1997; 47:273-287.
- Hoption Cann SA, Qiu Z, van Netten C. A prospective study of iodine status, thyroid function, and prostate cancer risk: follow-up of the First National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr Cancer* 2007; 58:28-34.

- Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*. 2000; 85:60-67.
- Huss WJ, Gray DR, Tavakoli K, Marmillion ME, Durham LE, Johnson MA, Greenberg NM, Smith GJ. Origin of androgen-insensitive poorly differentiated tumors in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Neoplasia*. 2007; 9:938-950.
- INEGI, Estadísticas con propósitos del Día Mundial contra el Cáncer. [Internet]. 2014. México [citado el 9 enero 2013]  
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2859&ep=113>
- Irshad S, Abate-Shen C. Modeling prostate cancer in mice: something old, something new, something premalignant, something metastatic. *Cancer Metastasis Rev*. 2013; 32:109-122.
- Kaplan-Lefko PJ, Chen TM, Ittmann MM, Barrios RJ, Ayala GE, Huss WJ, Maddison LA, Foster BA, Greenberg NM. Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *Prostate*. 2003; 55:219-237.
- Kessler JH. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *Breast J*. 2004; 10:328-336.
- Kogai T, Taki K, Brent GA. Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006; 13:797-826.
- Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E (Eds.). 2003. *Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc.
- Kumar VL, Majumder PK. Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol*. 1995; 27:231-243.
- Küpper FC, Schweigert N, Ar Cali E, Legendre JM, Vilter H, Koareg B. Iodine uptake in laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* 1998; 207:163–171.
- Lang SH, Frame FM, Collins AT. Prostate cancer stem cells. *J Pathol*. 2009; 217:299-306.
- 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 follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003; 111:325-329.
- Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, van Hasselt CA. Iodine induces apoptosis via regulating MAPKs-related p53, p21, and Bcl-xL in thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 320:128-135.
- Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, van Hasselt CA. Iodine mediated mechanisms and thyroid carcinoma. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009; 46:302-318.
- Lozano JA Cáncer de Próstata. Factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento. *OFFARM* 2004; 23:84-90.

- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 2003; 253:165-174.
- Mazaris E, Tsiotras A. Molecular pathways in prostate cancer. *Nephrourol Mon.* 2013; 5:792-800.
- McAlpine RK. The rate of the oxidation of iodide ion by hydrogen peroxide. *J Chem Educ.* 1945; 22:387-390.
- McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol.* 1988; 12:897-906.
- McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate.* 1981; 191; 2:35-49.
- Mendieta I, Nunez-Anita E, Delgado G, Aceves C. Differential effect of iodine on the implantation and metastatic potential of xenografts from two different human breast cancer cell lines [abstract]. En: Proceedings of the 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2011 Apr 2-6; Orlando, Florida. Philadelphia (PA): AACR; 2011. Abstract nr 4224.
- Narayanan BA, Narayanan NK, Pittman B, Reddy BS. Regression of mouse prostatic intraepithelial neoplasia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:7727-7737.
- Navarra M, Micali S, Lepore SM, Cesinaro AM, Celano M, Sighinolfi MC, De Gaetani C, Filetti S, Bianchi G, Russo D. Expression of the sodium/iodide symporter in human prostate adenocarcinoma. *Urology.* 2010; 75:773-778.
- Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349:366-381.
- Nguewa PA, Calvo A. Use of transgenic mice as models for prostate cancer chemoprevention. *Curr Mol Med.* 2010; 10:705-718.
- Nicola JP, Basquin C, Portulano C, Reyna-Neyra A, Paroder M, Carrasco N. The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter mediates active iodide uptake in the intestine. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 296:C654-C662.
- Norma Oficial Mexicana NOM- 062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [Internet]. 2001. Mexico: Diario Oficial de la Federación; [citado 2014Abr 4]. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>.
- Núñez-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. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009; 89:34-42.
- Nussey SS y Whitehead SA. 2001. *Endocrinology. An integrated approach.* BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Patel AR, Klein EA. Risk factors for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2009; 6:87-95.

- Patrick L. Iodine: deficiency and therapeutic considerations. *Altern Med Rev.* 2008; 13:116-127.
- Pearce EN. National trends in iodine nutrition: is everyone getting enough? *Thyroid.* 2007; 17:823-827.
- Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, Pourcher T. Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *J Endocrinol.* 2001; 170:185-196.
- Price D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1963; 12:1-27.
- 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.* 2010; 8:410-419.
- 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.
- Roumeguère T, Delree P, Van Antwerpen P, Rorive S, Vanhamme L, de Ryhove Lde L, Serteyn D, Wespes E, Vanhaerverbeek M, Boudjeltia KZ. Intriguing location of myeloperoxidase in the prostate: a preliminary immunohistochemical study. *Prostate.* 2012; 72:507-513.
- Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther.* 2013; 140: 223-238.
- Shappell SB, Olson SJ, Hannah SE, Manning S, Roberts RL, Masumori N, Jisaka M, Boeglin WE, Vader V, Dave DS, Shook MF, Thomas TZ, Funk CD, Brash AR, Matusik RJ. Elevated expression of 12/15-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in a transgenic mouse model of prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63:2256-2267.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the mouse models of human cancer consortium prostate pathology Committee *Cancer Res* 2004; 64:2270-2305.
- Shrivastava A, Tiwari M, Sinha RA, Kumar A, Balapure AK, Bajpai VK, Sharma R, Mitra K, Tandon A, Godbole MM. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *J Biol Chem.* 2006; 281:19762-19771.
- Sonoda T, Nagata Y, Mori M, Miyanaga N, Takashima N, Okumura K, Goto K, Naito S, Fujimoto K, Hirao Y, Takahashi A, Tsukamoto T, Fujioka T, Akaza H. A case-control study of diet and prostate cancer in Japan: possible protective effect of traditional Japanese diet. *Cancer Sci.* 1997; 95:238-242.

- Soriano O, Delgado G, Anguiano B, Petrosyan P, Molina-Servín ED, Gonsebatt ME, Aceves C. Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors: association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocr Relat Cancer*. 2011; 18:529-539.
- Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1746-1751.
- Súchil L. Epidemiología del cáncer de próstata. *Rev Oncología* 2001; 3:11-21.
- Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate *Biol Reprod*. 1986; 34:961-971.
- Taylor RA, Risbridger GP. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation*. 2008; 76:671-681.
- Thomasz L, Oglio R, Dagrosa MA, Krawiec L, Pisarev MA, Juvenal GJ. 6 Iodo-delta-lactone reproduces many but not all the effects of iodide. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 323:161-166.
- Thrall KD, Bull RJ, Sauer RL. Distribution of iodine into blood components of the Sprague-Dawley rat differs with the chemical form administered. *J Toxicol Environ Health*. 1992; 37:443-449.
- Van Sande J, Massart C, Beauwens R, Schoutens A, Costagliola S, Dumont JE, Wolff J. Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology*. 2003; 144:247-252.
- Venkateswaran V, Fleshner NE, Sugar LM, Klotz LH. Antioxidants block prostate cancer in lady transgenic mice. *Cancer Res*. 2004; 64:5891-5896.
- Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, Greco RS, Dohán O, Carrasco N. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:1880-1888.
- Yoshida A, Sasaki N, Mori A, Taniguchi S, Mitani Y, Ueta Y, Hattori K, Sato R, Hisatome I, Mori T, Shigemasa C, Kosugi S. Different electrophysiological character of  $I^-$ ,  $ClO_4^-$ , and  $SCN^-$  in the transport by  $Na^+/I^-$  symporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 231:731-734.
- Zeegers MP, Jellema A, Ostrer H. Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer*. 2003; 97:1894-1903.

# Iodine Uptake and Prostate Cancer in the TRAMP Mouse Model

Paloma Olvera-Caltzontzin, Guadalupe Delgado, Carmen Aceves, and Brenda Anguiano

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, México

Iodine supplementation exerts antitumor effects in several types of cancer. Iodide ( $I^-$ ) and iodine ( $I_2$ ) reduce cell proliferation and induce apoptosis in human prostate cancer cells (LNCaP and DU-145). Both chemical species decrease tumor growth in athymic mice xenografted with DU-145 cells. The aim of this study was to analyze the uptake and effects of iodine in a preclinical model of prostate cancer (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) mice/*SV40*-TAG antigens), which develops cancer by 12 wks of age.  $^{125}I^-$  and  $^{125}I_2$  uptake was analyzed in prostates from wild-type and TRAMP mice of 12 and 24 wks in the presence of perchlorate (inhibitor of the  $Na^+/I^-$  symporter (NIS)). *NIS* expression was quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Mice (6 wks old) were supplemented with 0.125 mg  $I^-$  plus 0.062 mg  $I_2$ /mouse/day for 12 or 24 wks. The weight of the genitourinary tract (GUT), the number of acini with lesions, cell proliferation (levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by immunohistochemistry), *p53* and *p21* expression (by qPCR) and apoptosis (relative amount of nucleosomes by enzyme-linked immunosorbent assay) were evaluated. In both age-groups, normal and tumoral prostates take up both forms of iodine, but only  $I^-$  uptake was blocked by perchlorate. Iodine supplementation prevented the overexpression of *NIS* in the TRAMP mice, but had no effect on the GUT weight, cell phenotype, proliferation or apoptosis. In TRAMP mice, iodine increased *p53* expression but had no effect on *p21* (a *p53*-dependent gene). Our data corroborate *NIS* involvement in  $I^-$  uptake and support the notion that another transporter mediates  $I_2$  uptake. Iodine did not prevent cancer progression. This result could be explained by a strong inactivation of the *p53* pathway by TAG antigens.

Online address: <http://www.molmed.org>  
doi: 10.2119/molmed.2013.00093

## INTRODUCTION

Prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer in men worldwide, with an incidence significantly lower in Japan than in the United States (22.7 versus 83.8/100,000 per year, respectively) (1). This lower risk has been associated with lifestyle factors such as diet. The traditional Japanese diet is high in fish (rich in omega-3 fatty acids), soybeans (isoflavones) and seaweeds (iodine) (2). Epidemiological studies show a possible association between high iodine intake and low risk of prostate cancer,

given that the daily intake of iodine in Japan is 25-fold higher than in Western countries (5,280  $\mu$ g in Japan versus 209  $\mu$ g in the US) (3,4).

This chemoprotection by iodine is also evident in thyroid and breast cancer, and it seems to be related to the ability of these tissues to take up and metabolize iodide ( $I^-$ ) and/or molecular iodine ( $I_2$ ) (5). It is well established that  $I^-$  uptake depends on the  $Na^+/I^-$  symporter (NIS), whereas the uptake of  $I_2$  is probably mediated by facilitated diffusion (6–8).  $I_2$  supplementation exerts antitumor effects

in thyroid, breast, neuroblastoma and lung carcinoma by arresting the cell cycle (increases *p53* and *p21* proteins), inducing apoptosis (dissipates mitochondrial membrane potential and increases Bax, caspases 3 and 7) and reducing mRNA expression of invasion genes (vascular endothelial growth factor [*VEGF*] and urokinase-type plasminogen activator [*uPA*]) (9–14). For  $I^-$  to exert some of these effects, it must be converted to an oxidized species of iodine by specific peroxidases (thyro-, lacto- or myeloperoxidase) (15–17).

The pathways by which  $I_2$  inhibits the carcinogenic process are not fully understood, but contributions of both direct (anti- or prooxidant) and indirect mechanisms (generation of iodolipids, iodinated derivatives of arachidonic acid) have been proposed (5). 6-Iodolactone (6-IL) is an iodolipid that reproduces some of the antitumorogenic effects mentioned above, and it has been suggested that 6-IL could function as a ligand/activator

---

**Address correspondence to** Brenda Anguiano, Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla, #3001, Querétaro, 76230, México. Phone and Fax: +52-442-2381067; E-mail: [anguiano@unam.mx](mailto:anguiano@unam.mx).

Submitted August 22, 2013; Accepted for publication November 7, 2013; Epub (www.molmed.org) ahead of print November 8, 2013.

for peroxisome proliferator-activated receptors (12,13,18–20).

There is evidence that prostate epithelium is an iodine-responsive target. In several species, *NIS* mRNA was detected in normal and cancerous prostate (21–23). In humans, *NIS* protein is present in 50–70% of adenocarcinomas (24). With regard to the effects of iodine, *in vitro* studies show that LNCaP and DU-145 prostate cancer cells take up both  $I^-$  and  $I_2$ , and treatment with either chemical species reduces cell proliferation and induces apoptosis (Bax caspases). Consistent with these results, supplementation in nude mice with both chemical species consistently reduces tumor growth of DU-145 xenografts (25). The aims of this study were to analyze the uptake and potential antineoplastic effects of a mixture of iodine and iodide in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) mice, a preclinical model of prostate cancer.

## MATERIALS AND METHODS

### Transgenic Animals

The TRAMP mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Heterozygous (TRAMP<sup>+/-</sup>) females were crossed with nontransgenic C57BL/6 males to generate heterozygous transgenic male offspring. In the TRAMP model, expression of *SV40* early genes (*TAG*) is driven by the prostate-specific promoter probasin. Long and short antigens inactivate p53 and Rb proteins as well as protein phosphatase 2, respectively, leading to the development of intraepithelial neoplasia (prostatic intraepithelial neoplasia [PIN]) and both well-differentiated and poorly differentiated cancer. Tail deoxyribonucleic acid (DNA) was used to determine the presence of the transgene by polymerase chain reaction (PCR). Experiments were approved by the Committee on Bioethics from the Universidad Nacional Autónoma de México, and procedures were carried out according to guidelines of the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (26).

### Radio-iodine Uptake Assay

Prostate tissue from wild-type and TRAMP mice of 12 and 24 wks was used to characterize the uptake of  $I^-$  and  $I_2$  by using  $^{125}I$  as a tracer (Na $^{125}I$ ; PerkinElmer, Waltham, MA, USA; specific activity: ~17 Ci [629 GBq]/mg). Oxidation of  $^{125}I^-$  to  $^{125}I_2$  was carried out according to the method described by McAlpine (27). Mice received intraperitoneal doses of  $^{125}I^-$  or  $^{125}I_2$  (0.001 Ci/kg body weight) and were euthanized after 5, 10, 15, 30, 60, 120 and 180 min. Thyroid gland was used as an internal positive control.

To analyze *NIS* involvement in iodine uptake, one group each of wild-type and TRAMP mice received intraperitoneal physiological saline solution or 25 mg perchlorate (ClO $_4^-$ ) (specific inhibitor of *NIS*) per kilogram body weight. Two hours after the ClO $_4^-$  injection, mice were injected with  $^{125}I^-$  or  $^{125}I_2$ , and after another 2 h, they were killed. This dose of ClO $_4^-$  inhibits >80% of iodide uptake in thyroid gland (positive control) (28). Thyroid, prostate and liver were collected, and the radiolabel was measured in counts per minute (cpm) in a  $\gamma$ -counter (Packard, Palo Alto, CA, USA). Radioactive iodine uptake by thyroid and prostate was normalized to liver uptake (negative control). Data are expressed as cpm per milligram thyroid or cpm per milligram prostate/cpm per milligram liver (23).

### Effects of Iodine Supplementation on Prostate Cancer Development

Male wild-type and TRAMP mice (6 wks old) were given drinking water supplemented with a mixture of iodine (0.125 mg  $I^-$  plus 0.062 mg  $I_2$ /day/mouse) for 12 or 24 wks. Body weight was registered every 2 wks. At the end of the experiments, mice were anesthetized with a ketamine and xylazine mixture (Cheminova, Mexico City, Mexico; 8 and 0.6 mg, respectively, per 100-g body weight) and killed by decapitation. The genitourinary tract (GUT) (prostate, bladder, seminal vesicles and urethra) was weighed, and the prostate was dissected. Prostate tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA) for histopathology and immunohistochemistry or frozen and stored at  $-70^\circ C$  to measure expression of the *NIS*, *p53* and *p21* genes by reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Blood was collected to determine the circulating levels of triiodothyronine (T3). At the time of necropsy, all organs were examined for gross abnormalities.

### Histopathology and Immunohistochemistry

The 5- $\mu m$ , paraffin-embedded sections of the dorso-lateral lobes were stained with hematoxylin-eosin for histopathology or were processed for immunohistochemical analysis. The pathological grading system used was that proposed by Kaplan-Lefko, which considers several criteria such as epithelial cytoarchitecture and the presence of mitosis, apoptosis and inflammation (28). The percentages of normal and pathological acini were registered. The analysis was carried out by quantifying the whole field of three animals per group at 20 $\times$  magnification.

Immunodetection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was used as an indicator of cell proliferation. Briefly, paraffin tissue sections were deparaffinized, rehydrated and heated in citrate buffer (pH 6.0). Sections were blocked with peroxidase block solution from DakoCytomation (Dako, Glostrup, Denmark), followed by bovine serum albumin and then incubated overnight at 4 $^\circ C$  with the anti-PCNA rabbit polyclonal primary antibody (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Slides were then reacted with biotin-labeled anti-rabbit IgG/anti-mouse IgG and developed in diaminobenzidine (DAB) (DakoCytomation). Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Tissue sections without primary antibody were used as negative control. The analysis was carried out under light microscopy (Leica DM 2500), and images were acquired with a Leica DFC 420 camera. The percentage of PCNA-positive cells was defined as the number of brown-stained



**Table 1.** Primers used in qPCR.

Gene	GeneBank	Sequence
<i>NIS</i>	NM_053248	CCGGATCAACCTGATGGACT CCTGAGGGTGCCACTGTAAG
<i>p53</i>	NM_001127233	TGAACCGCCGACCTATCCTTA GGCACAAACACGAACCTCAAA
<i>p21</i>	NM_001111099	ATGTCCAATCCTGGTGATGT TGCAGCAGGGCAGAGGAAGT
$\beta$ -Actin	NM_031144	GTCCCAGTATGCCTCTGGTCGTAC CCACGCTCGGTCAGGATCTTCATG

cells divided by the total number of cells in three randomly selected fields at 40 $\times$  magnification. The quantification of cells was performed with the Leica Application Suite (version 2.8.1).

### Circulating T3 Levels

To verify thyroid status, serum T3 levels were measured by a homologous radioimmunoassay previously standardized in our laboratory (30).

### Apoptosis

Apoptosis was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by using a cell death detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). This assay detects the relative amounts of mono- and oligo-nucleosomes. Data were normalized to DNA concentration. All samples exhibited at least twice the absorbance of the blank. The percent change of apoptosis was calculated, considering the prostatic levels of the non-supplemented wild-type mice as 100%.

### RT-qPCR (Real Time)

Total RNA was extracted by using the SV Total Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) and was reverse-transcribed by using oligo-deoxythymine. The sequence detector system Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) was used to perform qPCR with SYBRgreen. The reaction contained 2  $\mu$ g cDNA template and the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, CA, USA), using 40 cycles of three-step amplification (95 $^{\circ}$ C for 30 s, 55–60 $^{\circ}$ C for 30 s and 72 $^{\circ}$ C for 30 s). Table 1 shows the primers used in this study. PCR generated only the expected specific ampli-

con, which was demonstrated in each case by the melting temperature profile and by electrophoresis of the PCR product through a 2% agarose gel containing ethidium bromide in Tris-acetate-EDTA buffer. No PCR products were observed in the absence of template. Gene expression was calculated by using a standard curve and normalized to the content of  $\beta$ -actin. The coefficient of variation for this gene was <15%.

### Statistical Analysis

The data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences between groups were analyzed by using a two-way analysis of variance (ANOVA)

with a Bonferroni *post hoc* test and Student *t* test. Results were analyzed by using the statistical package GraphPad Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

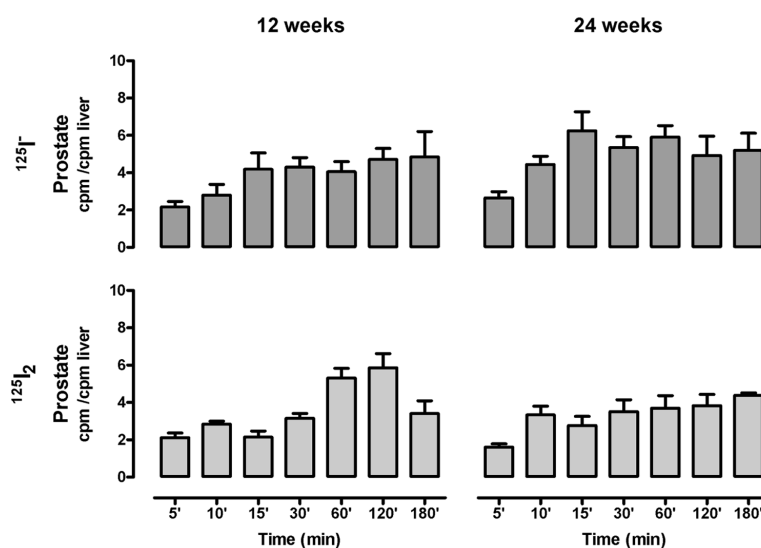
## RESULTS

### Time Course of Iodine Uptake

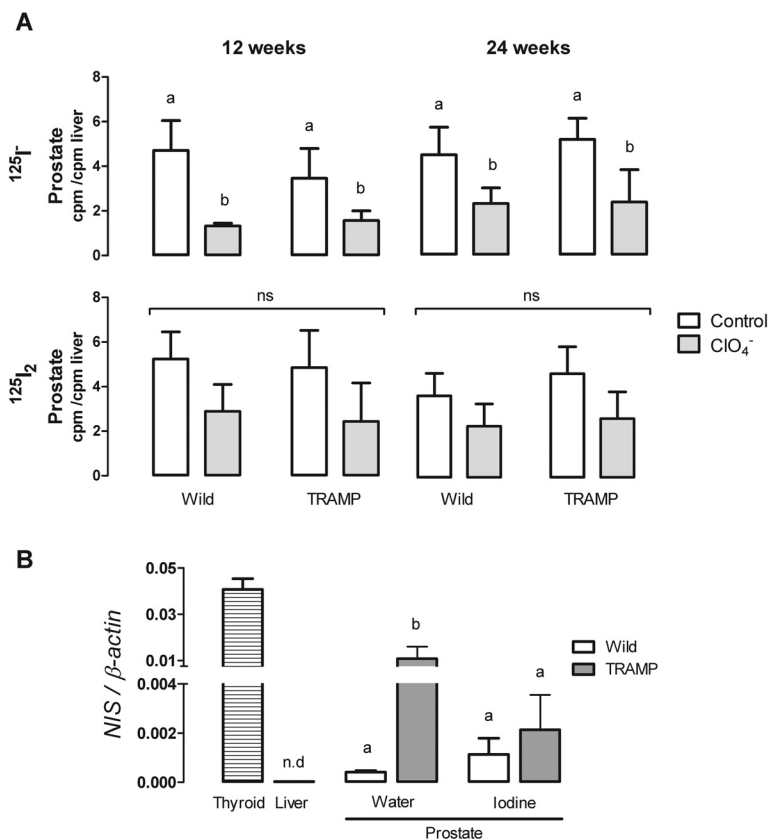
Figure 1 shows that normal prostate of 12- and 24-wk-old mice takes up  $^{125}\text{I}^-$  and  $^{125}\text{I}_2$  within the first 5 min. For both iodine types, sustained but not statistically significant increases were observed in 24-wk-old mice after 10 min.

### Expression of NIS and Its Involvement in Iodide Uptake

Figure 2A shows that both chemical species of iodine are taken up by normal and cancerous prostate of 12- and 24-wk-old mice. In all groups,  $^{125}\text{I}^-$  uptake was significantly inhibited by  $\text{ClO}_4^-$ . In contrast,  $\text{ClO}_4^-$  administration did not modify  $^{125}\text{I}_2$  uptake in any group. Figure 2B shows *NIS* expression in prostates from wild-type and TRAMP mice of 30 wks. TRAMP mice exhibited high *NIS* expression compared to wild-type mice.



**Figure 1.** Time course for the uptake of iodide ( $^{125}\text{I}^-$ ) or iodine ( $^{125}\text{I}_2$ ) in normal prostate. Mice of 12 or 24 wks of age were intraperitoneally injected with either  $^{125}\text{I}^-$  or  $^{125}\text{I}_2$  (0.001 Ci/kg body weight) and were killed from 5 to 180 min after tracer administration. Tissues were weighed and the radioactivity measured (cpm). Prostate iodine uptake was expressed as cpm per mg prostate/cpm per mg liver (nonuptake organ). No significant differences were found.  $n = 3$ –6 per group.



**Figure 2.** (A) <sup>125</sup>I uptake in normal (wild type) or tumoral (TRAMP) prostate. Mice of 12 or 24 wks received an injection of saline (control) or perchlorate (ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>); 2 h later, they were intraperitoneally injected with 0.001 Ci/kg body weight of either <sup>125</sup>I<sup>-</sup> or <sup>125</sup>I<sub>2</sub>. Mice were killed 2 h after tracer administration, and iodine uptake was analyzed as described in Figure 1. (B) Effect of iodine on *NIS* mRNA expression in normal and tumoral prostate. Iodine was supplemented for 24 wks (starting at 6 wks old). Thyroid and liver were used as positive and negative controls, respectively. *NIS* expression was analyzed by RT-qPCR. Data were analyzed using a two-way ANOVA, followed by the Bonferroni *post hoc* test. Different letters indicate significant differences between groups (*p* < 0.05). n.d., Not detected; n = 4–6 per group.

Chronic iodine supplementation (24 wks) decreased TRAMP *NIS* overexpression to values similar to those of the wild-type mice.

**Effect of Iodine Supplementation on the Development of Prostate Cancer**

Figure 3 shows that iodine supplementation for 12 or 24 wks had no effect on body weight. The data show a significant increase in the GUT weight of TRAMP mice in comparison to wild-type mice at both ages. Iodine supplementation had no effect on the GUT weight or circulating levels of T3 (data not shown).

As expected, wild-type mice showed a normal histological phenotype, whereas TRAMP mice exhibited a well-differentiated cancer (Figure 4). A detailed analysis in TRAMP mice showed that around 40% of acini had a normal phenotype, whereas 5–10% of acini exhibited a high-grade PIN (epithelial stratification, cribriform structures, nuclear pleomorphism, hyperchromatic nuclei), and around 50% exhibited a well-differentiated cancer (loss of intraductal spaces and invasion of basal membrane). However, iodine supplementation for 12 or 24 wks did not modify the

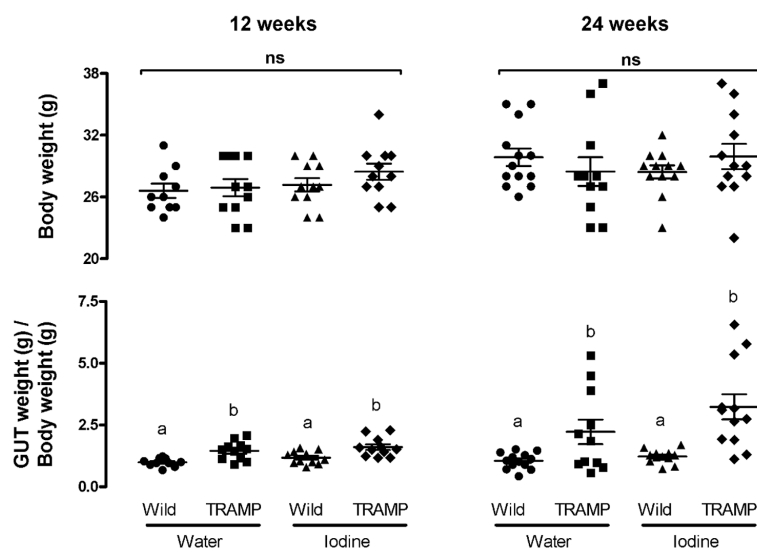
normal (wild type) or tumor phenotype (TRAMP).

In relation to indicators of cell proliferation, our data showed a higher number of PCNA-positive cells in prostate tumors (TRAMP) than in normal prostate (wild type) (Figure 5). However, iodine supplementation for 12 or 24 wks did not modify the PCNA levels in any group. Figure 6 shows that iodine supplementation significantly increased *p53* mRNA expression but had no effect on *p21* expression in tumors from 24-wk-old TRAMP mice. We found no differences in apoptosis between control and iodine-supplemented groups of normal and cancerous prostate (Figure 7).

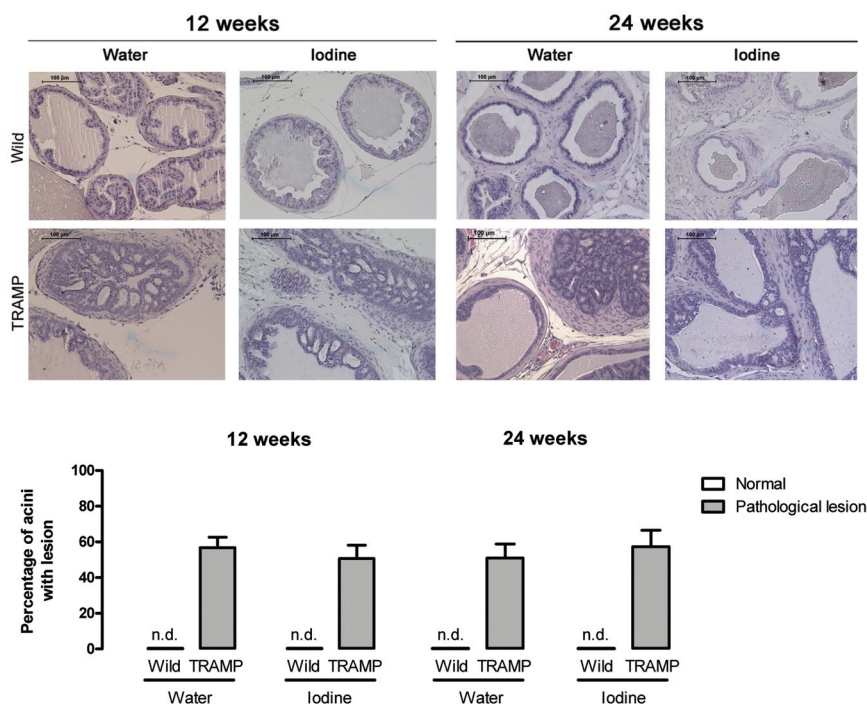
**DISCUSSION**

The present study was designed to explore if continued supplementation with iodine inhibits or delays the development of prostate cancer in the TRAMP model. Our data showed that, although cancerous prostate takes up both I<sup>-</sup> and I<sub>2</sub>, supplementation with a mixture of the two species of iodine for 12 or 24 wks does not reproduce the antitumor effects previously reported in an *in vitro* model of prostate cancer (25).

This study shows the ability of cancerous prostate to take up I<sup>-</sup> and I<sub>2</sub>. *NIS* expression and the inhibition of I<sup>-</sup> uptake by ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> (specific inhibitor of *NIS* symporter) in normal and cancerous prostate confirm that iodide uptake is *NIS* dependent. These data are in accord with a clinical study indicating that around 50% of human prostate tumors express *NIS* protein (24), but they differ with studies in LNCaP and DU-145 cells showing that I<sup>-</sup> uptake is *NIS* independent (25). This mechanistic difference between *in vivo* and *in vitro* models could be explained by the tumor heterogeneity. Our data show that cancerous prostate overexpresses *NIS*, but this increase is not functionally associated with higher I<sup>-</sup> influx. This dissociation between *NIS* transcription and iodide uptake has also been reported to occur in other cancers as part of the tumorigenic process. Well-differentiated thyroid and breast cancers



**Figure 3.** Effect of iodine on body and GUT weight of wild-type or TRAMP mice. Iodine was supplemented for 12 or 24 wks. Control groups received drinking water without iodine. Data were analyzed by using a two-way ANOVA, followed by Bonferroni *post hoc* test. Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).  $n = 10$ –13 per group.

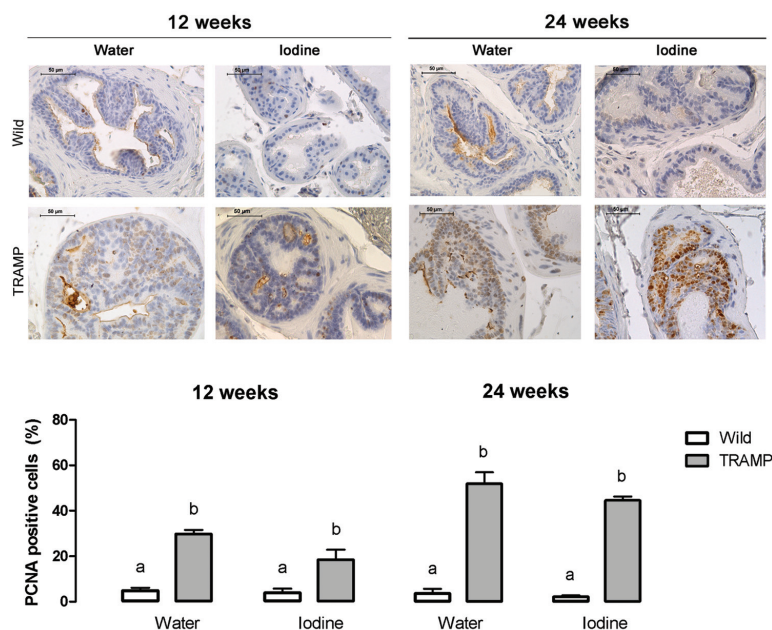


**Figure 4.** Effect of iodine on histology of normal or tumoral prostate. Iodine was supplemented for 12 or 24 wks. Representative images of prostates stained with hematoxylin-eosin are shown (magnification 20 $\times$ ). Histopathology analysis was made according to the criteria proposed by Kaplan-Lefko *et al.* (29). The percentage of acini with pathological lesions (PIN and well-differentiated cancer) is shown. Data were analyzed by using a two-way ANOVA, followed by a Bonferroni *post hoc* test. No significant differences were found between groups. n.d., Not detected;  $n = 4$ –6 per group.

express high levels of *NIS* compared with their normal counterparts; however, this expression decreases to undetectable levels when the cancer becomes undifferentiated (16,31–34). Our data show that iodine supplementation for 24 wks does not modify the basal expression of *NIS* in normal prostate, but it prevents the overexpression in cancerous prostate. In contrast, studies in breast tumors have shown that iodine supplementation induces *NIS* expression. These studies discussed the possibility that *NIS* upregulation by iodine might be associated with tumor redifferentiation (16,30).

With regard to  $I_2$  uptake, no significant blockade by  $ClO_4^-$  was observed in any group, corroborating an *NIS*-independent mechanism. These data agree with studies in human cell lines of prostate and breast cancer (8,25). There is evidence that  $I_2$  uptake depends on protein synthesis, independent of ATP and  $Na^+/K^+$  ATPase (8). A *NIS*-independent mechanism for  $I_2$  uptake has also been demonstrated in sea urchin larvae and seaweeds (7,35), suggesting that this mechanism could be widespread in nature.

The functional relevance of iodine for the prostate gland is still unknown, but data from our group have shown anti-growth effects in models of prostatic diseases (25,36). The present study showed that iodine supplementation for 12 or 24 wks did not modify the GUT weight, incidence of lesions, cell proliferation or apoptosis in wild-type or TRAMP mice. This insensitivity to iodine contrasts with studies in benign prostate hyperplasia or cancer prostate cells that show (a)  $I^-$  or  $I_2$  supplementation prevents prostate hyperplasia induced by sexual hormones in rats (36); (b)  $I^-$  or  $I_2$  treatments reduce cell proliferation and induce apoptosis by a BAX caspase pathway in LNCaP and DU-145 cells; and (c) iodine supplementation (same schedule of administration used in the current study) reduces the tumor growth in nude mice xenografted with DU-145 cells (25). These data support the notion that the null response observed in TRAMP mice is not associated with the chemical species or schedule of

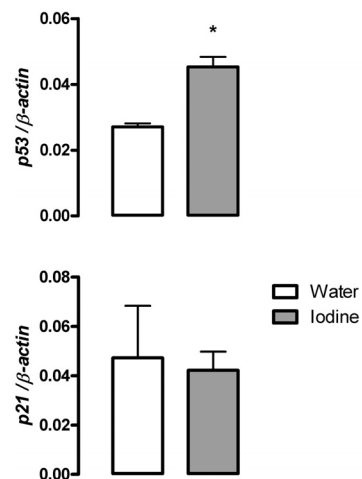


**Figure 5.** Effect of iodine on the percentage of PCNA-positive cells in normal or tumoral prostate. Iodine was supplemented for 12 or 24 wks. Representative immunohistochemical images from each group are shown (magnification 40x). Slides are counterstained with hematoxylin. Data were analyzed by using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).  $n = 4-7$  per group.

administration of iodine or with the origin of prostatic cells (rodents versus human). Instead, the insensitivity to iodine seems to be related to the mechanisms underlying the carcinogenic process in the TRAMP model. Studies in breast cancer cells (MCF-7) show a significant increase of p53 protein and, consequently, increased levels of p21 and Bax proteins as part of the anti-tumor mechanism of  $I_2$  (11,12). In the current study we found an increase of p53 expression but no increase of its target gene p21. The functional inhibition of p53 has been described in the TRAMP model as a consequence of the strong constitutive expression of the oncoprotein TAG, which directly inactivates anti-tumoral proteins such as p53 and Rb. There are controversies related to the sensitivity of prostate toward chemotherapeutic agents in the TRAMP model; some studies have validated its efficacy (37), but others have concluded that it represents an aggressive model of carcinogenesis (diffuse tumor, invasion

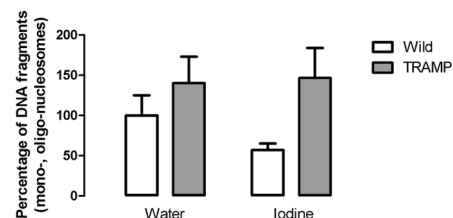
of seminal vesicles and fast transition from low- to high-grade invasion) (38). Some antiinflammatory drugs such as celecoxib or exisulind exhibit important protection against development of early lesions (PIN), but they do not prevent the transition to adenocarcinoma. This partial protection has been explained as a coordinated activation of p53-dependent (p21/Bax) and p53-independent pathways (inhibition of nuclear factor  $\kappa$ -light-chain enhancer of activated B cells [NF- $\kappa$ B], cyclooxygenase-2, phosphatidylinositol 3-kinase [PI3K]/serine threonine kinase [AKT]/p27). Moreover, in studies using different compounds or diet conditions (low fat, energy restriction) whose action mechanisms involve the inhibition of p53-independent pathways (androgen receptor, NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT, protein kinase C $\epsilon$ , and so on), these drugs have only a modest anti-tumor effect on this model (39-41).

On the other hand, there is evidence that iodine could also act against cancer progression, by preventing or delaying



**Figure 6.** Effect of iodine on the expression of p53 and p21 mRNA in tumoral prostate. Iodine was supplemented for 24 wks. Gene expression was analyzed by RT-qPCR. Data were analyzed using a Student *t* test. \* $p < 0.05$ .  $n = 3$  per group.

the acquisition of invasion mechanisms. In breast cancer models, it has been shown that iodine supplementation inhibits expression of the VEGF and uPA genes (13,14). Our study shows that none of the TRAMP mice (control or iodine supplemented) developed a phenotype of



**Figure 7.** Effect of iodine in the induction of apoptosis (percentage of DNA fragments) in normal or tumoral prostate. Iodine was supplemented for 24 wks. The amount of mono- and oligo-nucleosomes was determined by ELISA. Data were normalized with respect to DNA concentration. The percentage of change of apoptosis was calculated considering the levels of the nonsupplemented wild-type prostate as 100%. Data were analyzed by using a two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test. No significant differences were found between groups ( $p < 0.05$ ).  $n = 4-5$  per group.

undifferentiated cancer at 18 or 30 wks. Nevertheless, in the TRAMP model, it was found that prostate cancer could progress to an invasive neuroendocrine phenotype (42,43). It would be interesting to analyze the role of iodine in the acquisition of the neuroendocrine phenotype, since recent studies in neuroblastoma cells show that I<sub>2</sub> induces antiproliferative effects and sensitizes these cells to the differentiating effects of retinoic acid (9,44).

## CONCLUSION

Our data show that although normal and cancerous prostate take up both I<sup>-</sup> and I<sub>2</sub>, the supplementation with a mixture of these two forms of iodine does not modify the physiopathology of the prostate. The inability of iodine to induce cell arrest or apoptosis could be explained by continued and exacerbated expression of TAG-oncoprotein (inhibitor of p53 and Rb) in the TRAMP model. Studies in less aggressive preclinical models, whose action mechanism does not involve a direct inactivation of p53, will be necessary to better understand the iodine effects on prostate tumor biology.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica. Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM; IN202513, IN200813) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; 127368, 176911). P Olvera-Caltzontzin was a graduate student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received a scholarship from CONACYT (215709). The authors thank Martín García, Alejandra Castilla, and Moisés Pérez-Mendoza for technical assistance; Francisco Valles, Leonor Casanova and Lourdes Lara for academic support; Ramon Martínez, Alberto Lara and Omar González for computer assistance; and Dr. Dorothy Pless for proofreading.

## DISCLOSURE

The authors declare that they have no competing interests as defined by *Molecu-*

*lar Medicine*, or other interests that might be perceived to influence the results and discussion reported in this paper.

## REFERENCES

1. Ferlay J, et al. (2010) GLOBOCAN 2008 v2.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer-Base no. 10 [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; [cited 2013 Dec 4]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Sonoda T, et al. (1997) A case-control study of diet and prostate cancer in Japan: possible protective effect of traditional Japanese diet. *Cancer Sci.* 95:238–42.
3. Key TJ, Silcocks PB, Davey GK, Appleby PN, Bishop DT. (1997) A case-control study of diet and prostate cancer. *Br. J. Cancer.* 76:678–87.
4. Hopton Cann SA, Qiu Z, van Netten C. (2007) A prospective study of iodine status, thyroid function, and prostate cancer risk: follow-up of the First National Health and Nutrition Examination Survey. *Nutr. Cancer.* 58:28–34.
5. Aceves C, Anguiano B, Delgado G. (2013) The extrathyronine actions of iodine: antioxidant, apoptotic and differentiator factor in iodine-uptake tissues. *Thyroid.* 23:938–46.
6. Bizhanova A, Kopp P. (2009) Minireview: the sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology.* 150:1084–90.
7. Küpper FC, et al. (1998) Iodine uptake in laminae involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta.* 207:163–71.
8. Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C. (2006) Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr. Relat. Cancer.* 13:1147–58.
9. Rösner H, Torremante P, Möller W, Gärtner R. (2010) 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.* 8:410–9.
10. Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, van Hasselt CA. (2010) Iodine induces apoptosis via regulating MAPKs-related p53, p21, and Bcl-xL in thyroid cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320:128–35.
11. Shrivastava A, et al. (2006) Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 281:19762–71.
12. Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. (2008) 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.* 15:1003–11.
13. Aceves C, et al. (2009) Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Mol. Cancer.* 8:33–41.
14. Mendieta I, Nunez-Anita E, Delgado G, Aceves C. (2011) Differential effect of iodine on the implantation and metastatic potential of xenografts from two different human breast cancer cell lines [abstract]. *Cancer Res.* 71(8 Suppl):Abstract nr 4224.
15. Huang M, et al. (2001) Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Ther.* 8:612–8.
16. Soriano O, et al. (2011) Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors: association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocr. Relat. Cancer.* 18:529–39.
17. Vitale M, et al. (2000) Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology.* 141:598–605.
18. Langer R, Burzler C, Bechtner G, Gärtner R. (2003) Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis: evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 111:325–9.
19. Thomasz L, et al. (2010) 6 Iodo-delta-lactone reproduces many but not all the effects of iodide. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323:161–6.
20. Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. (2009) A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89:34–42.
21. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. (1998) Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:1746–51.
22. Lacroix L, et al. (2001) Na(+)/I(-) symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *Eur. J. Endocrinol.* 144:297–302.
23. Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, Pourcher T. (2001) Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *J. Endocrinol.* 170:185–96.
24. Navarra M, et al. (2010) Expression of the sodium/iodide symporter in human prostate adenocarcinoma. *Urology.* 75:773–8.
25. Aranda N, Sosa S, Delgado G, Aceves C, Anguiano B. (2013) Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in differentiated and undifferentiated human prostate cancer cell lines. *Prostate.* 73:31–41.
26. (2001 Aug 22) Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Mexico City: Diario Oficial de la Federación; [cited 2013 Dec 4]. Available from: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>.

27. McAlpine RK. (1945) The rate of oxidation of iodide ion by hydrogen peroxide. *J. Chem. Educ.* 22:387–90.
28. York RG, et al. (2005) Refining the effects observed in a developmental neurobehavioral study of ammonium perchlorate administered orally in drinking water to rats. I. Thyroid and reproductive effects. *Int. J. Toxicol.* 24:403–18.
29. Kaplan-Lefko PJ, et al. (2003) Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *Prostate.* 55:219–37.
30. Anguiano B, García-Solís P, Delgado G, Aceves Velasco C. (2007) Uptake and gene expression with antitumoral doses of iodine in thyroid and mammary gland: evidence that chronic administration has no harmful effects. *Thyroid.* 17:851–9.
31. Dohán O, Baloch Z, Bánrévi Z, Livolsi V, Carrasco N. (2001) Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na(+)/I(-) symporter (*NIS*) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:2697–700.
32. Wapnir IL, et al. (2003) Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:1880–8.
33. Wapnir IL, et al. (2004) The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. *Clin. Cancer Res.* 10:4294–302.
34. Kollecker I, et al. (2012) Subcellular distribution of the sodium iodide symporter in benign and malignant thyroid tissues. *Thyroid.* 22:529–35.
35. Miller AE, Heyland A. (2013) Iodine accumulation in sea urchin larvae is dependent on peroxide. *J. Exp. Biol.* 216:915–26.
36. Aceves C, Anguiano B. (2009) Is Iodine an Antioxidant and Antiproliferative Agent for the Mammary and Prostate Glands? In: *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Endocrine and Pathological Aspects*. Preedy VR, Burrow GN, Watson RR (eds.) London, Academic Press (Elsevier), pp. 249–57.
37. Nguewa PA, Calvo A. (2010) Use of transgenic mice as models for prostate cancer chemoprevention. *Curr. Mol. Med.* 10:705–18.
38. Gupta S, et al. (2004) Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cancer Res.* 64:3334–43.
39. Narayanan BA, Narayanan NK, Pittman B, Reddy BS. (2004) Regression of mouse prostatic intraepithelial neoplasia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Clin. Cancer Res.* 10:7727–37.
40. Bonorden MJ, et al. (2012) Growth and progression of TRAMP prostate tumors in relationship to diet and obesity. *Prostate Cancer.* 2012:543970.
41. Berman-Booty LD, et al. (2013) Suppression of prostate epithelial proliferation and intraprostatic progrowth signaling in transgenic mice by a new energy restriction-mimetic agent. *Cancer Prev. Res. (Phila).* 6:232–41.
42. Huss WJ, et al. (2007) Origin of androgen-insensitive poorly differentiated tumors in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Neoplasia.* 9:938–50.
43. Chiaverotti T, et al. (2008) Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 172:236–46.
44. Godoy-García L, Nava-Villalba M, Delgado G, Aceves C. (2013) Molecular iodine adjuvancy in the antineoplastic effect of retinoic acid on neuroblastoma cells [abstract]. *Eur. J. Cancer.* 49 Suppl 2:S363.