



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS Y HORMONAS
TIROIDEAS EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. EN C. EVANGELINA DELGADO GONZÁLEZ

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. TERESA MORALES GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
FACULTAD DE MEDICINA**

JURIQUILLA, QUERÉTARO, SEPTIEMBRE 2016



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.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, bajo la dirección de la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano.

Este trabajo fue apoyado por PAPIIT-UNAM (IN202513) y CONACyT (235961, 127368, 176911). Evangelina Delgado González recibió beca CONACyT (202474) y PAPIIT (IN202513).

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por el apoyo PAPIIT-UNAM (202513), y al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca 202474 (CVU 206078), esenciales para la realización de este proyecto.

Al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Unidad de **Enseñanza y Posgrado del Instituto de Neurobiología**: M. en C. Leonor Casanova Rico y Carmen Mendoza López.

A la **Unidad de Videoconferencia del Instituto de Neurobiología**: Lic. Lourdes Lara Ayala.

Al personal de la **Biblioteca Central del Campus Juriquilla**: Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y a la Lic. Soledad Medina Malagón.

A la **Unidad de Cómputo del Instituto de Neurobiología**: Ing. Ramón Martínez Olvera, M. en C. Alberto Lara Ruvalcaba, Ing. Omar González Hernández e Ing. Sandra Hernández García.

A la **Dra. Dorothy Pless** por su aportación en la edición en inglés de la publicación.

A la **Unidad de Bioterio del Instituto de Neurobiología**: Dr. Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla León.

Al grupo de trabajo de la **Dra. Erika Patricia Patricia Rendón Huerta**, del Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM, quienes me entrenaron para la realización de ensayos de invasión celular.

A la **Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie**, cuya colaboración en la parte de inmunohistoquímica fue muy importante en este trabajo.

A los miembros de mi **Comité Tutoral**: Dra. María Teresa Morales Guzmán, y Dra. Erika Patricia Rendón Huerta, quienes semestralmente avalaron y mejoraron el avance de este proyecto.

A los miembros de mi **Jurado**: Dr. Manuel Salas Alvarado, Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas, Dra. Marcela Lizano Soberón y Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy, quienes enriquecieron esta tesis con sus oportunas aportaciones.

A mi Tutora: **Dra. Brenda Anguiano Serrano**, por sus permanentes enseñanzas, y sobre todo, por su paciencia.

A la **Dra. Carmen Aceves Velasco** (mi otra Tutora), por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A mis compañeros del **Laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología**, los de ayer y los de hoy (larga lista).

A mis compañeros **Técnicos Académicos del Instituto de Neurobiología**, por su constante solidaridad, ayuda y apoyo.

A todo el personal de los Laboratorios de **Fisiología Evolutiva y Bioquímica de Hormonas** del Instituto de Neurobiología (los vecinos).

DEDICATORIAS

... A Lupita Delgado, que diario está conmigo.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	7
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	14
1. PRÓSTATA	14
1.1 Generalidades	14
1.2 Función	15
1.3 Tipos celulares	15
1.4 Inervación autónoma	16
2. CÁNCER DE PRÓSTATA	19
2.1 Generalidades	19
2.2 Estimulación β -adrenérgica como un factor tumorigénico	19
2.3 Mecanismos de diferenciación neuroendócrina	21
3. HORMONAS TIROIDEAS	23
3.1 Generalidades	23
3.2 Cáncer	23
3.3 Próstata normal y tumoral	25
4. INTERACCIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS CON LA VÍA β -ADRENÉRGICA	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	30
1. Objetivo general	30
2. Objetivos particulares	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31

1. REACTIVOS	31
2. MODELOS BIOLÓGICOS	31
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	33
3.1 Efecto de la estimulación β-adrenérgica y/o T3 en tumores prostáticos de origen humano (LNCaP), generados en ratones inmunosuprimidos. Incidencia, crecimiento y progresión tumoral	33
3.2 Efecto de la estimulación β-adrenérgica, T3 y/o T4 sobre la formación de procesos tipo neurita, secreción de VEGF y capacidad invasiva, en células humanas de cáncer prostático LNCaP (poco invasivas) y DU145 (invasivas)	33
4. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	35
4.1 Cuantificación de niveles séricos y tumorales de T3	35
4.2 Análisis de la expresión génica	35
4.3 Inmunohistoquímica para detectar la presencia de SYP y VEGF	37
4.4 Morfología de tipo neuroendócrino	38
4.5 Niveles y secreción de VEGF	38
4.6 Invasión celular	38
4.7 Expresión de CREB total y fosforilado	39
4.8 Estadística	40
RESULTADOS	41
1. Efecto de la estimulación β-adrenérgica y/o T3 sobre la progresión de tumores prostáticos de origen humano (LNCaP), generados en ratones inmunosuprimidos.	41
1.1 Peso corporal, incidencia y crecimiento tumoral	41
1.2 Niveles de T3 y expresión génica asociada a la respuesta tiroidea	41
1.2.1 Cuantificación de niveles séricos y tumorales de T3	41
1.2.2 Expresión génica asociada a la respuesta tiroidea	42

1.3 Expresión génica y proteica asociada a fenotipo neuroendócrino e invasión	43
1.3.1 Genes de epitelio prostático	43
1.3.2 Genes asociados al fenotipo neuroendócrino	44
1.3.3 Expresión de SYP como marcador de fenotipo neuroendócrino	44
1.3.4 Genes asociados a invasión	45
1.3.5 Expresión de VEGF como marcador de progresión tumoral	46
2. Efecto de la estimulación β-adrenérgica, T3 y/o T4 sobre la formación de procesos tipo neurita, secreción de VEGF y capacidad invasiva, en células humanas de cáncer prostático LNCaP (poco invasivas) y DU145 (invasivas)	46
2.1 Morfología de tipo neuroendócrino	47
2.1.1 Células LNCaP	47
2.1.2 Células DU145	48
2.2 Secreción de VEGF y capacidad invasiva	49
2.2.1 Células LNCaP	49
2.2.2 Células DU145	50
2.3 Fosforilación de CREB en células LNCaP	50
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

°C	Grados centígrados
¹²⁵ I-T3	T3 marcada con yodo 125
ADRβ-2	Receptor beta adrenérgico tipo 2
ADRβ-3	Receptor beta adrenérgico tipo 3
Akt	Proteína cinasa B
ANOVA	Análisis de varianza
AP1	Proteína activadora 1
AR	Receptor de andrógenos
ARA 70	Proteína asociada al receptor de andrógenos 70
ATPasa	Adenosina trifosfato fosfatasa
BPH	Hiperplasia prostática benigna
BTG-2	Gen de translocación de células B-2
Ca	Calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CgA	Cromogranina A
cre	Elemento de respuesta a cAMP
CREB	Proteína de unión al elemento responsivo a cAMP
D1	Desyodasa 1
D2	Desyodasa 2
D3	Desyodasa 3
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithiotreitol
E.E.	Error estándar
ECL	Quimioluminiscencia enzimática
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EIA	Ensayo inmunoenzimático
EPAC	Proteínas de intercambio activada directamente por cAMP
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
g	Gramos
GATA1	Factor de transcripción de globina
HT	Hormonas tiroideas
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
ISO	Isoproterenol
K	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
LNCaP	Carcinoma prostático a nódulo linfático
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	Cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos
Mg	Magnesio

ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMP-2	Metaloproteasa de matriz 2
MMP-9	Metaloproteasa de matriz 9
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
NSE	Enolasa neuronal específica
p/v	Peso/volumen
PBP	Proteína de unión a la próstata
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pCREB	CREB fosforilado
PET	Tereftalato de polietileno
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PLC	Fosfolipasa C
pmol	Picomol
PSA	Antígeno prostático específico
PTHrP	Péptido relacionado a la hormona paratiroidea
REST	Factor silenciador RE-1
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RPTP- α	Receptor de tirosín fosfatasa tipo α
rT3	T3 reversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en sodio duodecil sulfato
SYP	Sinaptofisina
T3	3,3',5-triyodotironina
T4	3,3',5,5'-tetrayodotironina, tiroxina
TBS	Tris-buffer salino
TRAMP	Adenocarcinoma prostático en ratón transgénico
TRE	Elemento de respuesta a hormona tiroidea
TR- α 1	Receptor de hormona tiroidea α tipo 1
TR- β 1	Receptor de hormona tiroidea β tipo 1
T-TBS	TBS suplementado con Tween 20
uPA	Uroquinasa activadora de plasminógeno
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
X	Media
μ M	Micromolar

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de un plano lateral de la próstata humana	14
Figura 2. Distribución de los diferentes tipos celulares en la próstata	15
Figura 3. Vías de señalización canónica de los receptores adrenérgicos	17
Figura 4. Etapas del cáncer de próstata	19
Figura 5. Representación de un ensayo de invasión celular	39
Figura 6. Efecto de la administración de ISO, T3 y ambos en el peso corporal, incidencia y crecimiento tumoral	41
Figura 7. Niveles séricos y tumorales de T3	42
Figura 8. Expresión génica asociada a respuesta a T3	43
Figura 9. Expresión de genes de epitelio prostático	44
Figura 10. Expresión de genes asociados a fenotipo neuroendócrino	44
Figura 11. Expresión de SYP en tumores de xenotransplantes	45
Figura 12. Expresión de genes asociados a invasión	46
Figura 13. Expresión de VEGF en tumores de xenotransplantes	47
Figura 14. Fotomicrografías representativas de las proyecciones tipo neurita, longitud y número de procesos en células LNCaP	48
Figura 15. Fotomicrografías representativas de las proyecciones tipo neurita, longitud y número de procesos en células DU145	49
Figura 16. Secreción de VEGF y capacidad invasiva de las células LNCaP	50
Figura 17. Secreción de VEGF y capacidad invasiva de las células DU145	50
Figura 18. Fosforilación de CREB en células LNCaP	51
Figura 19. Propuesta del mecanismo a través del cual la señalización β -adrenérgica y la T4 podrían sinérgicamente favorecer la progresión del cáncer prostático, y cómo la T3 podría antagonizar esta respuesta adrenérgica	58
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real	37

RESUMEN

Las hormonas tiroideas están representadas por la tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Se conoce que la próstata responde a estímulos tiroideos y adrenérgicos, y que la NA promueve la generación de T3 en la glándula prostática. En el cáncer prostático, la activación de la vía β -adrenérgica (cAMP/PKA) estimula la progresión tumoral (adquisición del fenotipo neuroendócrino e invasión celular), mientras que la T3 estimula la proliferación, pero se desconoce su contribución en la progresión. Se desconoce el efecto de la T4 en el cáncer prostático, pero en otras neoplasias, estimula la angiogénesis e invasión celular. En esta tesis se evaluó el efecto sólo y combinado de la activación β -adrenérgica (isoproterenol, ISO) y hormonas tiroideas, en la progresión del cáncer prostático. *In vivo*, ratones atímicos (nu/nu), inoculados con células humanas de cáncer prostático (LNCaP) fueron tratados con el agonista β -adrenérgico ISO (200 $\mu\text{g}/\text{día}$), T3 (2.5 $\mu\text{g}/\text{día}$) o ambos durante 6 semanas. El tratamiento con ISO redujo el crecimiento tumoral, pero incrementó la expresión de genes (PCR tiempo real) asociados a progresión tumoral dependientes de CRE (cromogranina A, enolasa específica de neurona, survivina, factor de crecimiento vascular [VEGF], uroquinasa de plasminógeno, metaloproteasa-9), y algunas proteínas asociadas al fenotipo neuroendócrino y/o invasión celular (sinaptofisina, VEGF, pCREB). T3 redujo el crecimiento tumoral, y previno el aumento de los factores protumorales (genes o proteínas) estimulados por el ISO, a través de un mecanismo independiente de pCREB. *In vitro*, el tratamiento con ISO (50 μM) y T4 (100 nM) incrementó el número y longitud de procesos neuríticos, incrementó la secreción de VEGF y la capacidad invasiva de las células LNCaP (bajo potencial invasivo), pero efectos sinérgicos no fueron observados con la coadministración ISO+T4. En contraste, la administración de T3 (10 nM), no tuvo efectos por sí sola, pero previno la morfología neuroendócrina, secreción de VEGF y capacidad invasiva inducida por el ISO. Ninguno de estos tratamientos tuvo efectos en las células DU145 (alto potencial invasivo). Estos hallazgos confirman los efectos protumorales de la activación β -adrenérgica, y sugieren que la relación T4/T3 podría ser relevante en la progresión del cáncer. Estos efectos novedosos de las hormonas tiroideas contribuyen a un mejor entendimiento de las patologías prostáticas.

ABSTRACT

Thyroid hormones are represented by thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3). It is known that the prostate responds to thyroid and adrenergic stimuli, since NA promotes T3 generation in the prostatic gland. In prostate cancer, activation of β -adrenergic pathway (cAMP/PKA) stimulates tumor progression (acquisition of neuroendocrine phenotype and cell invasion), while T3 increases proliferation, but its role in progression is unknown. The effect of T4 in prostate cancer is unknown, but in other neoplasias, it facilitates angiogenesis and cell invasion. In this thesis, the effect of the β -adrenergic activation (isoproterenol, ISO) and thyroid hormones, on the progression of prostate cancer was evaluated. *In vivo*, athymic mice (nu/nu), xenografted with human prostate cancer cells (LNCaP), were treated with a β -adrenergic agonist ISO (200 μ g/day), T3 (2.5 μ g/day) or both for 6 weeks. ISO treatment reduced tumor growth, but increased the expression of CRE dependent genes (real-time PCR) associated with tumor progression (chromogranin A, neuron-specific enolase, survivin, vascular endothelial growth factor [VEGF], urokinase plasmin activator), and some proteins associated with neuroendocrine phenotype and/or cell invasion (synaptophysin, VEGF, pCREB). T3 reduced the tumor growth, and prevented the increase of pro-tumoral factors (genes or proteins) stimulated by ISO, through a pCREB independent mechanism. *In vitro*, the administration of ISO (50 μ M) and T4 (100 nM) increased the number and length of neuritic processes, VEGF secretion and invasive capacity of LNCaP cells (low invasive potential), but synergistic effects were not observed with the co-administration of ISO+T4. In contrast, T3 (10nM) administration did not have effects alone, but prevented neuroendocrine morphology, VEGF secretion and the invasive capacity induced by ISO. None of these treatments had effect on DU145 cells (high invasive potential). These findings confirm the protumoral effects of β -adrenergic activation and suggest that the T4/T3 ratio could be relevant on the progression of cancer. These novel effects of thyroid hormones contribute to a major understanding and knowledge in prostate diseases.

INTRODUCCIÓN

La próstata es una glándula accesoria del tracto reproductor masculino, cuyos productos de secreción contribuyen a la viabilidad y movilidad de los espermatozoides (Knobil y Neill, 1994). Está presente en todos los mamíferos, pero sólo los humanos son susceptibles de desarrollar patologías, como la hiperplasia y el cáncer.

El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte por cáncer en varones mayores de 50 años, cuya etiología y progresión están asociadas a múltiples factores ambientales y hereditarios (Center et al., 2012; American Cancer Society, 2015). Existen evidencias de que la hiperactividad adrenérgica asociada con la obesidad o el estrés crónico, son factores que favorecen la progresión de esta enfermedad (Braadland et al., 2015; Parikesit et al., 2016). Estudios *in vivo* e *in vitro* de cáncer de próstata, muestran que la estimulación β -adrenérgica (vía Adenosín monofosfato cíclico/Proteína fosforilada de unión al elemento responsivo a cAMP [cAMP/pCREB]) participa favoreciendo procesos tumorales, como la sobrevivencia celular, angiogénesis, invasión y metástasis. Estos eventos están asociados con la adquisición de un fenotipo neuroendócrino, el cual es altamente invasivo, y desde el punto de vista clínico es de bajo pronóstico (Cox et al., 1999; Palm et al., 2005; Sastry et al., 2007; Bavadekar et al., 2013).

La participación de las hormonas tiroideas (HT) en el cáncer es controversial. En algunos tipos de cánceres (ovario, páncreas, glioma), la tiroxina (T4) y/o la triyodotironina (T3) inducen efectos proliferativos y angiogénicos (Lin et al., 2009; Pinto et al., 2011; Moriggi et al., 2011); pero en otros (neuroblastoma, glándula mamaria, hígado), la T3 reduce la proliferación celular, induce apoptosis y promueve la re-diferenciación celular (Moriggi et al., 2011; Moeller y Fuhrer 2013; Pérez-Juste y Aranda, 1999; Perra et al., 2009; Sar et al., 2011). En modelos *in vitro* de cáncer prostático, se mostró que la T3 estimula la proliferación celular (Zhang et al., 1999; Hsieh y Juang, 2005); pero se desconoce su participación en la fisiopatología de este cáncer.

Las hormonas tiroideas y la vía β -adrenérgica interactúan a diferentes niveles. La T3 estimula la respuesta β -adrenérgica a través de promover la expresión y/o

actividad de diferentes elementos de la vía, e inducir un sinergismo transcripcional, en genes cuyo promotor contiene elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) y a AMP cíclico (CRE) (Silva y Bianco, 2008). Por otra parte, en genes que no contienen sitios TRE, pero sí CRE, se ha identificado que la activación del complejo T3-receptor nuclear, inhibe la activación de CREB (fosforilación), lo cual se refleja en una inhibición de la transcripción de genes que contienen CRE (Méndez-Pertuz et al., 2003, Fukuyama et al., 2006; Chen et al., 2011).

El propósito de esta tesis fue explorar el efecto solo y/o combinado de la estimulación β -adrenérgica y por las hormonas tiroideas en la progresión del cáncer de próstata. Los antecedentes de esta tesis se dividen en cuatro secciones, en las cuales se revisan aspectos generales de la fisiopatología prostática, y se enfatiza la contribución de la vía β -adrenérgica y de las hormonas tiroideas en el cáncer prostático. Posteriormente se plantea el problema, la hipótesis de trabajo, y se describen los métodos y técnicas utilizadas. Se presentan los resultados, la discusión y las conclusiones. El artículo publicado se adjunta en un anexo.

ANTECEDENTES

1. PRÓSTATA

1.1 Generalidades

La próstata es una glándula accesoria del tracto reproductor masculino, exclusiva de los mamíferos. En humanos y roedores se desarrolla en el segundo tercio de la gestación, a partir del seno urogenital (Marker et al., 2003). La maduración y funcionalidad de esta glándula, ocurren hasta la pubertad, y depende de la participación tanto de factores locales (factores de crecimiento), como del sistema nervioso autónomo (noradrenalina, acetilcolina, péptidos), y de mensajeros endócrinos (andrógenos, estrógenos, prolactina y HT) (McVary et al., 1994; Marker et al., 2003).

Es una glándula de secreción mixta túbulo-alveolar, que rodea la uretra, y se localiza debajo de la vejiga urinaria. En términos anatómicos y patológicos, la próstata humana se divide en cuatro zonas. La zona periférica representa el 75% de la próstata, y es más susceptible de desarrollar cáncer. La zona de transición rodea completamente la uretra prostática, comprende menos del 5% de la masa prostática, es escasa en acinos, está conformada primordialmente por ductos y es la región con mayor susceptibilidad a desarrollar hiperplasia prostática benigna (BPH). La zona central está situada entre la zona de transición y la periférica, y es atravesada por los conductos eyaculadores, comprende el 20% de la glándula, y es poco susceptible a desarrollar cáncer. La zona anterior o fibromuscular prácticamente no contiene acinos ni estructuras ductales (Figura 1) (Knobil y Neill, 1994; Santamaría y Alonso, 2007).

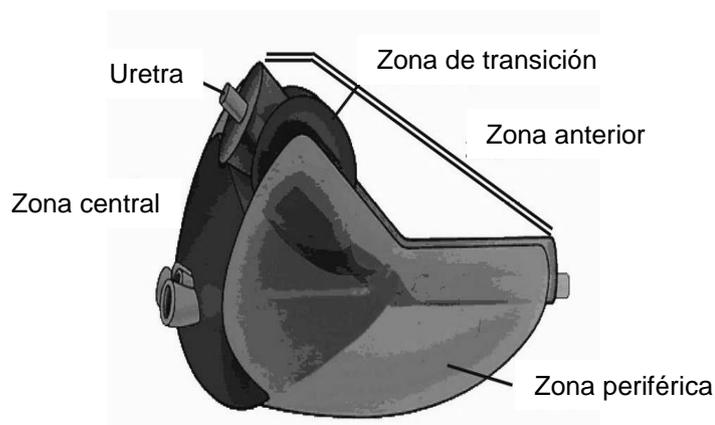


Figura 1. Esquema de un plano lateral de la próstata humana (Imagen modificada de Rodríguez y Carballido, 2007).

1.2 Función

La próstata está organizada en acinos y ductos, cuya unidad funcional está conformada por una monocapa de células epiteliales polarizadas. La próstata produce y secreta una serie de componentes al plasma seminal, los cuales contribuyen a mantener la viabilidad, movilidad y función de los espermatozoides (Knobil y Neill, 1994). La secreción prostática es ligeramente ácida (pH 6.5), y entre sus principales componentes destacan enzimas, como la fosfatasa ácida prostática, el antígeno específico prostático (PSA), la fibrinolusina, además de otros compuestos como la proteína de unión prostática (PBP), el ácido cítrico, fructosa, poliaminas (espermina, espermidina y putrescina), prostaglandinas, colesterol, lípidos y zinc. Existen evidencias que algunos de estos componentes son esenciales para una adecuada fecundación e implantación del embrión (Chow y O, 1989). El proceso secretor de la próstata corresponde al tipo apócrino (desprendimiento de la región apical de la célula junto con el producto de secreción) y merócrino (liberación del producto de secreción por exocitosis) (Groos et al., 1999; Andrade-Rocha, 2007).

1.3 Tipos celulares

La próstata está compuesta por diversos tipos celulares (Figura 2), entre los que se encuentran las células epiteliales o secretoras (dependientes de hormonas), las células neuroendócrinas, las células basales y el estroma (Cunha et al., 1987; 2004).

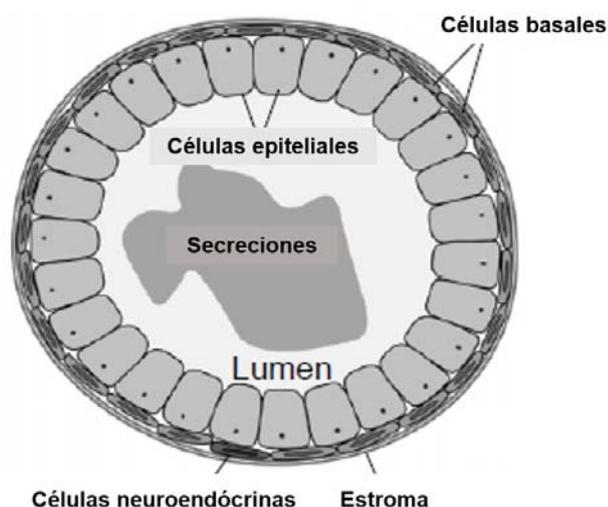


Figura 2. Distribución de los diferentes tipos celulares en la próstata humana. (Modificado de Abate-Shen y Shen, 2002).

Las células epiteliales o secretoras son las más abundantes, y dependen principalmente de andrógenos para su crecimiento, sobrevivencia y diferenciación. Presentan un arreglo en monocapa en el que se destaca una región basal y apical (polarización) (Marker et al., 2003).

Las células neuroendócrinas forman parte del epitelio glandular y se localizan de manera irregular en la base de las células secretoras (cerradas) o bien intercaladas entre ellas (abiertas). Las abiertas tienen procesos citoplásmicos apicales, que se extienden al lumen; mientras que las cerradas se encuentran en la región basal, no tienen contacto directo con el lumen, y presentan procesos tipo neurita (Perrot, 2012; Komiya et al., 2009). Aunque el origen y función de estas células se encuentra en debate, se ha propuesto que su origen puede ser neural, o bien diferenciarse a partir de células basales (Berruti et al., 2010). En relación a su función se ha propuesto que estas células participan tanto en el desarrollo prostático, como en la regulación de procesos secretores de manera autócrina y parácrina. Son células que comparten algunas propiedades estructurales, funcionales y metabólicas con las neuronas (Cindolo et al., 2007). No expresan receptor a los andrógenos, pero expresan varios neuropéptidos (cromograninas A [CgA] y B [CgB], sinaptofisina (SYP), neuropéptido Y, calcitonina, enolasa neuronal específica [NSE], somatostatina), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y sintetizan algunas aminas (serotonina y noradrenalina) (Bonkhoff et al., 1995; Abrahamsson, 1999; Komiya et al., 2009).

1.4 Inervación autónoma

El sistema nervioso autónomo, a través de su división simpática y parasimpática, controla el tono vascular y la secreción de la próstata, a través de estimular la contractilidad de los alvéolos y de los túbulos (Jänig, 2006). La contractilidad depende del nervio hipogástrico (inervación simpática) (Bruschini et al., 1978), mientras que el proceso secretor depende del nervio pélvico (inervación parasimpática) (Jacobs y Story, 1989). Ambos tipos de fibras convergen al ganglio pélvico (Wang et al., 1991; Keast, 1999).

La próstata expresa receptores adrenérgicos α (subtipos 1 y 2) y β (subtipos 2 y 3) (McVary et al., 1998; Goepel et al., 1997). Los receptores α_1 señalizan a través de

la vía de receptores acoplados a proteínas Gq (fosfolipasa C/Inositol 1,4,5-trifosfato+diacilglicerol/Calcio [PLC/IP₃+DAG/Ca²⁺]), mientras que los α₂ a través de receptores acoplados a proteínas Gi (inhibición de la adenilato ciclasa). Por otro lado, los receptores β₂ y β₃ señalizan a través de la vía de receptores acoplados a proteínas Gs (Adenil-ciclasa/cAMP/proteína cinasa A [PKA]/CREB) (Figura 3). La activación del nervio hipogástrico, estimula los receptores del subtipo α₁ del tejido fibro-muscular que rodea a los túbulos y controla la expulsión del contenido prostático a la uretra (Bruschini et al., 1978). En contraste, los receptores β están presentes en el epitelio prostático y su activación estimula la síntesis de varios componentes de la secreción prostática, como la proteína unida a la próstata (McVary et al., 1994), la fosfatasa ácida y estimula la liberación de zinc (Plecas et al., 2000). Existen evidencias de que la inervación simpática también controla el crecimiento de la próstata. La simpatectomía unilateral atrofía de manera ipsilateral el epitelio prostático, y reduce el peso y su contenido de DNA (McVary et al., 1994). Más aún, la denervación química de la próstata con la toxina botulínica (neurotóxico de fibras simpáticas), disminuye el tamaño de la glándula a través de mecanismos apoptóticos (Silva et al., 2008; 2009).

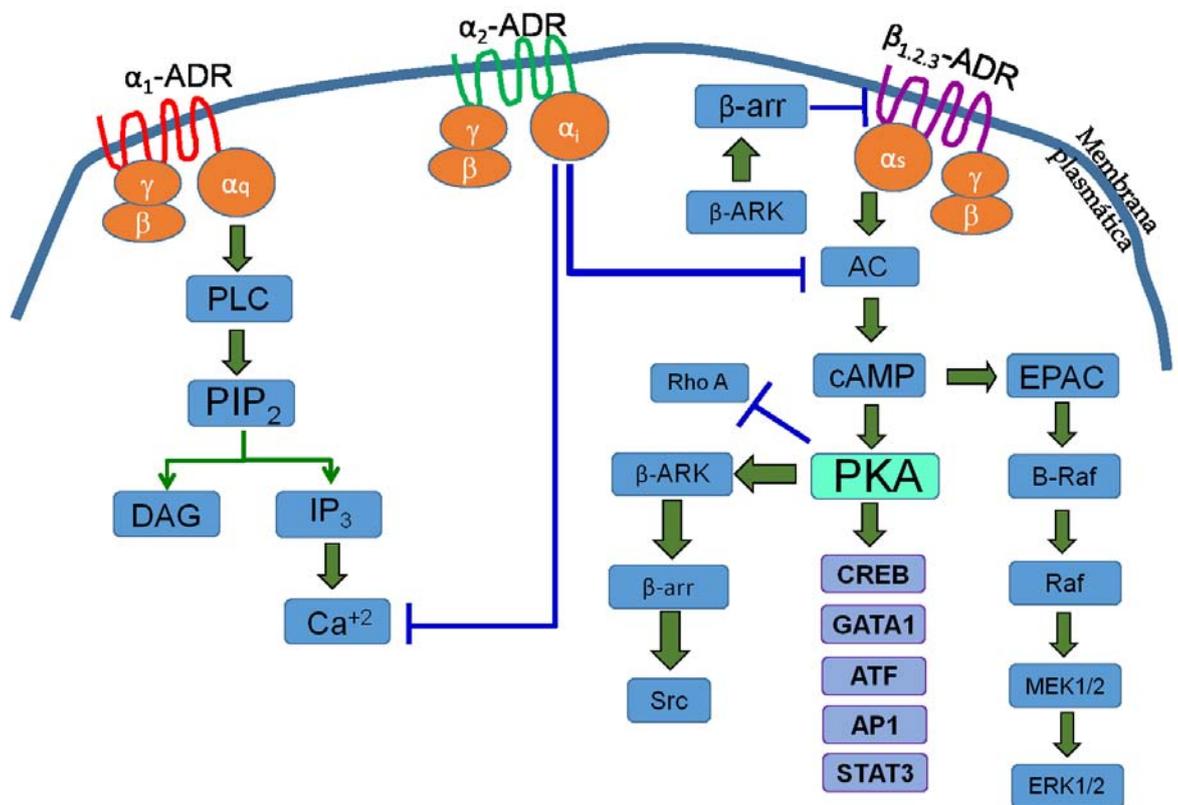


Figura 3. Vías de señalización canónica de los receptores adrenérgicos. Representación de los mecanismos intracelulares de los receptores adrenérgicos tipo α (1 y 2) y β (1, 2 y 3), los cuales son acoplados a proteínas G. Los receptores subtipo α₁ señalizan a través de la vía de fosfolipasa C (PLC), cuya respuesta final es producir diacilglicerol (DAG) y liberación de calcio por el retículo endoplásmico.

Los receptores subtipo α_2 funcionan de manera contraria, inhibiendo la liberación de calcio, y como inhibidores de la adenilato ciclasa (AC), la cual es muy importante en la señalización de los receptores tipo β , que dan como respuesta final canónica la activación de genes dependientes de CREB. Se muestra una vía alterna de señalización donde el AMP cíclico (cAMP), además de activar a la proteína cinasa A (PKA), activa a las proteínas de intercambio activadas directamente por cAMP (EPAC), que a su vez activan la vía de señalización MAPK. La regulación de los receptores β -adrenérgicos se lleva a cabo activando a la cinasa del receptor β -adrenérgico (β -ARK), que hace que la β -arrestina fosforile al receptor β -adrenérgico, impidiendo su unión con el ligando, además de que puede activar a Src, e inducir otra serie de respuestas tumorigénicas (Modificado de Cole y Sood, 2012).

En estudios farmacológicos se ha mostrado la presencia de receptores muscarínicos en el epitelio prostático, y que su activación aumenta la secreción prostática (Maggi, 1993). Estudios *in vivo* muestran que la sección preganglionar unilateral del nervio pélvico, aumenta el peso, el contenido de proteína y de DNA del lóbulo ventral contralateral, pero no afecta el lóbulo ipsilateral (McVary et al., 1994).

2. CÁNCER DE PRÓSTATA

2.1 Generalidades

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por un crecimiento descontrolado de las células, las cuales adquieren la capacidad de invadir otros tejidos y provocar metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000).

En países occidentales, el cáncer de próstata es la segunda causa de muerte por cáncer (Center et al., 2012). En la mayoría de los casos, el cáncer prostático se origina en la zona periférica e invade el tejido adyacente como las vesículas seminales y cuello de la vejiga, y genera metástasis a nódulos linfáticos, hueso, pulmón e hígado (Gittes, 1991). En etapas tempranas del cáncer, las células epiteliales prostáticas proliferan y se estratifican, además de presentar hiper cromatismo y desorden en la lámina basal. Esto se conoce como neoplasia intraepitelial, y se cree que es una lesión precursora del cáncer prostático. En etapas tardías, esta lesión se acompaña de procesos de invasión (angiogénesis, sobrevivencia, degradación de lámina basal) y metástasis (extravasación, migración y colonización en sitios distantes) (Figura 4) (Bostwick et al., 1987).

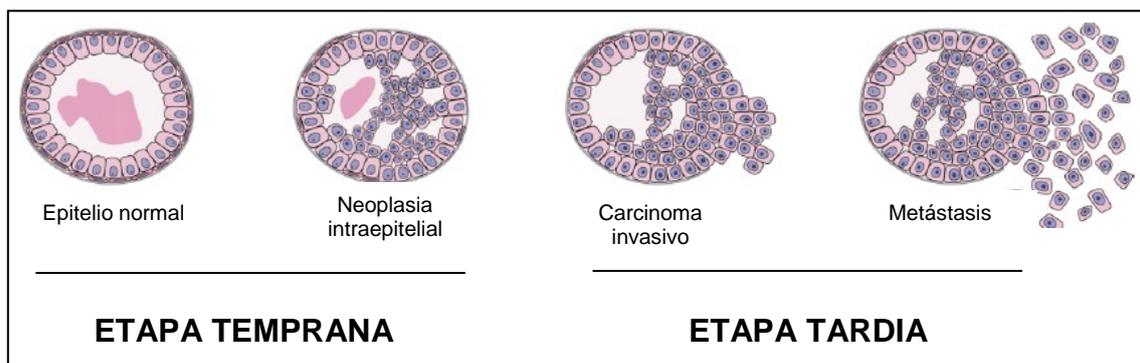


Figura 4. Etapas del cáncer de próstata humano. (Modificado de Abate-Shen y Shen, 2002).

2.2 Estimulación β -adrenérgica como un factor tumorigénico

En distintos tejidos, se conoce que el sistema nervioso simpático, es activado en condiciones de estrés crónico, y mediante aproximaciones *in vivo*, e *in vitro*, se ha sugerido que esta activación sostenida (activación β -adrenérgica), participa en la

progresión del cáncer, estimulando procesos de angiogénesis (incremento de VEGF), invasión (incremento de metaloproteasas 2 y 9 [MMP-2, MMP-9]) y metástasis (Thaker et al., 2006; 2007; Lutgendorf et al., 2003; Yang et al., 2006; 2008; 2009).

En el cáncer prostático también existe una asociación entre el estado adrenérgico y el riesgo o progresión del cáncer (Rao et al., 2008). Estudios clínicos muestran que los pacientes hipertensos tienen un riesgo más alto de desarrollar hiperplasia y cáncer prostático (Gann et al., 1995; Platz et al., 1998; Ganesh et al., 2011); mientras que los pacientes hipertensos tratados crónicamente con antagonistas α y β adrenérgicos, presentan un menor riesgo (Platz et al., 1998; Perron et al., 2004; Harris et al., 2007; Grytli et al., 2013). También un menor riesgo ha sido observado en pacientes con lesiones de médula espinal (Bartoletti et al., 2009). En concordancia, se sabe que los tumores prostáticos presentan una mayor densidad nerviosa con respecto a una glándula no cancerosa (Ayala et al., 2008); y que el receptor β -adrenérgico se encuentra incrementado en pacientes con cáncer de próstata quimiorresistentes (Ramberg et al., 2008).

A nivel experimental (*in vivo*) se ha observado que el tono simpático participa en la implantación tumoral y en la progresión del cáncer prostático. La falta de un aporte adrenérgico (simpatectomía), o bien la nula expresión de los receptores β -adrenérgicos (*Adr β 2^{-/-}Adr β 3^{-/-}*) cancela el desarrollo de los tumores, en modelos de ratones transgénicos o inmunosuprimidos (Magnon et al., 2013). También se ha reportado que el tratamiento con noradrenalina aumenta el número de metástasis a nódulo linfático, y que dicho efecto se inhibe en los animales tratados con antagonistas β -adrenérgicos (Palm et al., 2006).

En células de cáncer prostático se ha reportado que el tratamiento con adrenalina o con agonistas β -adrenérgicos, favorece la sobrevivencia celular, la adquisición de un fenotipo neuroendócrino, asociado a la capacidad invasiva de estas células (Cox et al., 1999; Lang et al., 2004; Sastry et al., 2007). En conjunto, estos estudios son consistentes y ponen en evidencia la importancia del tono simpático en la progresión del cáncer.

2.3 Mecanismos de diferenciación neuroendócrina

Como se mencionó anteriormente, existen estudios que muestran que la estimulación β -adrenérgica favorece la adquisición del fenotipo neuroendócrino. Estas células, al ser independientes de la regulación por andrógenos, se cree que podrían participar en la progresión del cáncer prostático independiente de andrógenos, y por lo tanto, tener un bajo pronóstico desde un punto de vista clínico (Komiya et al., 2009).

En tumores de pacientes con cáncer de próstata, se han identificado algunos marcadores neuroendócrinos, como CgA y NSE, y su presencia correlaciona con metástasis y baja supervivencia (McWilliam et al., 1997).

La estimulación β -adrenérgica es uno de los factores más estudiados como inductor de diferenciación neuroendócrina (Braadland et al., 2015), y se ha reportado que la fosforilación de CREB (vía cAMP/PKA), podría ser uno de los efectores involucrados en el arresto celular (vía proteína de intercambio activada por cAMP [EPAC]/p38) y en la adquisición de procesos tipo neurita (vía factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rap 2 /proteína relacionada con Ras/proteína cinasa activada por mitógenos/cinasa regulada por señales extracelulares (Rapgef2/Rap1/MEK/ERK) (Bang et al., 1994; Cox et al., 1999; 2000; Deeble et al., 2001; Emery et al., 2014).

Además de la estimulación β -adrenérgica, existen otros factores que promueven la diferenciación neuroendócrina, como son la falta de andrógenos, la transición epitelio-mesénquima y la presencia de citocinas (Deeble et al., 2001; Yuan et al., 2006; Conteduca et al., 2014).

Estudios *in vitro* muestran que la administración de antagonistas del receptor de andrógenos, o la depleción hormonal del medio de cultivo, activa al receptor de tirosina-cinasa RPTP α y favorece la diferenciación neuronal (morfología y expresión de marcadores neuroendócrinos), a través de la activación de la vía MEK/ERK (Zhang et al., 2003).

Existe la evidencia de que la sobreexpresión del factor de transcripción Snail en células LNCaP (cáncer prostático) induce la transición epitelio-mesénquima y la

adquisición de un fenotipo neuroendócrino. Además, se ha observado que los péptidos secretados ejercen efectos proliferativos (McKeithen et al., 2010).

Se ha observado que interleucina-6 (IL-6), sola o combinada con la activación β -adrenérgica favorece la transdiferenciación neuroendócrina en el cáncer de próstata, a través de inhibir al factor de transcripción RE-1 silencing factor (REST), el cual inhibe la expresión de genes neuronales (Zhu et al., 2014). En combinación con epinefrina, la IL-6 tiene efectos potenciadores en la adquisición de características morfológicas y expresión de péptidos neuroendócrinos, sin alterar su propia vía de señalización, y convergiendo en la activación de la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos MAPK (Deeble et al., 2001).

3. HORMONAS TIROIDEAS

3.1 Generalidades

Las HT participan en el crecimiento, diferenciación y metabolismo de los tejidos, a través de su unión a receptores nucleares (TR) α y β (Mullur et al., 2014). Éstos pueden formar homo o heterodímeros con el receptor de ácido retinoico (RXR) para formar el complejo TR/RXR, el cual se une a elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) en las regiones promotoras de sus genes blanco. Esta unión activa el reclutamiento de co-activadores o co-represores que regulan la expresión génica (Mondal et al., 2016).

Las HT también pueden actuar activando vías de segundos mensajeros, ya sea a través de los propios TRs, o a través de la integrina $\alpha v \beta 3$, que funciona como receptor de membrana, de manera que se activan vías de señalización como las MAPK, fosfoinositol 3-cinasa (PI3-K), así como la actividad de bombas de iones de membrana, como la ATPasa de sodio/potasio, modulación de cambios en el gradiente de protones y señalización por calcio en la mitocondria, polimerización de filamentos de actina-F en el citoesqueleto (Davis et al., 2008; Cheng et al., 2010).

Las HT están representadas principalmente por la T4, y la T3. La conversión extratiroidea de T4 a T3 es un proceso catalizado por 2 tipos de enzimas, la desyodasa tipo 1 (D1) y tipo 2 (D2). Asimismo, la desyodasa tipo 1 y tipo 3 (D3) catalizan la conversión de la T4 a su metabolito inactivo, la T3 reversa (rT3). Este mecanismo de desyodación opera en todos los órganos, regulando la disponibilidad de T3, durante los períodos críticos del desarrollo y funcionalidad (Gereben et al., 2008).

3.2 Cáncer

Los efectos y mecanismos de las HT en el cáncer no están completamente entendidos. A continuación se mencionan algunos ejemplos de cómo las HT inducen efectos pro- o antitumorales, dependiendo del tipo celular y contexto fisiológico.

No es muy claro si existe una relación entre el estado tiroideo (hipo- o hipertiroidismo) y el riesgo a desarrollar algún tipo de cáncer. Reportes epidemiológicos asocian al estado hipotiroideo con un mayor riesgo de desarrollar cáncer hepático, pero menor riesgo de desarrollar cáncer de colon, pulmón, mamario o prostático (Hassan et al., 2009; Moeller y Führer, 2013). Sin embargo, la evidencia epidemiológica no siempre concuerda con los hallazgos experimentales.

En modelos de carcinoma hepático, renal, ovárico, glioma y pulmón, existe la evidencia que la administración de T4 y la T3 ejercen efectos pro-tumorales, estimulando la proliferación celular, angiogénesis, sobrevivencia e invasión, por mecanismos nucleares (receptores nucleares TR- α y β) y/o no nucleares (integrina $\alpha\beta3$ /activación de las vías MAPK y PI3-K). En términos generales, se considera que los efectos pro-tumorales de la T4 están mediados por su interacción con el receptor de integrina $\alpha\beta3$, mientras que los efectos antitumorales de la T3 están asociados a los receptores nucleares (Mousa et al., 2006; Lin et al., 2009; Moriggi et al., 2011; Pinto et al., 2011; Shinderman-Maman et al., 2016).

Sin embargo, en modelos animales también existe la evidencia que el hipotiroidismo local o sistémico (disminución en niveles séricos), podría estar involucrado en la progresión del cáncer. Un estudio asociativo muestra que la progresión del cáncer de piel, estómago y hemangioma cursa con una disminución en los niveles tumorales de T3 (hipotiroidismo local) (Ciavardelli et al., 2014). Más aún, el hipotiroidismo sistémico inducido en ratones inmunosuprimidos, retrasa la aparición y el crecimiento tumoral de xenotransplantes (hepáticos y mamarios), pero favorece la adquisición de un fenotipo más agresivo (transición epitelio-mesénquima), invasividad y metástasis (Martínez-Iglesias et al., 2009), sugiriendo que la falta de HT podría favorecer en la progresión tumoral. En concordancia, estudios en neuroblastoma, cáncer mamario y/o tiroideo, han mostrado que la administración de T3 induce arresto celular (disminución de Ras y aumento en p27^{kip}), apoptosis (disminución en la proteína de senescencia SMP30), reduce el potencial invasivo y/o induce rediferenciación celular (Pérez-Juste y Aranda, 1999; Perra et al., 2009; Sar et al., 2011; Kim et al., 2014; Frau et al., 2015).

3.3 Próstata normal y tumoral

Existen pocos estudios sobre la participación de las hormonas tiroideas en el desarrollo y función de la próstata. Se conoce que el hipotiroidismo neonatal y durante la gestación, reduce el tamaño de la próstata, y que la deficiencia de estas hormonas, antes de la pubertad, reduce de manera lóbulo-específica la actividad de una gran variedad de enzimas involucradas en procesos de transporte activo y del metabolismo de carbohidratos (fosfatasa acida, fosfatasa alcalina, ATPasa dependiente de sodio/potasio, calcio, magnesio y glucosidasas), sugiriendo su participación en el desarrollo y función de esta glándula (Aruldas et al., 2010; Maran et al., 2000, 2002; Sidhartan et al., 1993).

Estudios de nuestro laboratorio han mostrado la presencia de la enzima D1 en la próstata de rata (Anguiano et al., 2006). Como ya se mencionó, la D1 participa en la generación de tironinas inactivas o activas (T3), y se ha mostrado una asociación entre la actividad enzimática y los niveles prostáticos de T3 (López-Juárez et al., 2009). En la próstata, esta enzima se expresa a partir de la pre-pubertad, alcanza los valores más altos en la pubertad-madurez sexual, y declina gradualmente con la edad. Sin embargo, la actividad sexual continua evita el decline de la actividad enzimática asociado a la edad (López-Juárez et al., 2009). Se ha mostrado que la inervación simpática (nervio hipogástrico) regula positivamente la actividad D1 y consecuentemente la generación prostática de T3 (Delgado González, et al., 2011).

Existen pocos estudios clínicos que relacionen las HT y al cáncer prostático. Un estudio retrospectivo en pacientes con cáncer de próstata mostró que el hipotiroidismo reduce el riesgo de desarrollarlo (Mondul et al., 2012); pero en otro estudio, pacientes con cáncer cursan con altos niveles de T3 (Lehrer et al., 2002).

En un modelo de carcinogénesis en un ratón transgénico, se encontró que la progresión del tumor hacia un estado más indiferenciado, se acompañó de una disminución en los niveles tumorales de T3 (Angulo-Barbosa, 2014). Por otra parte, en la línea celular LNCaP (cáncer prostático poco invasivo), se encontró que el tratamiento con T3 estimula la proliferación celular (reduce la expresión del gen de translocación celular B [BTG-2]), y promueve la expresión de algunas proteínas

distintivas de epitelio prostático. Sin embargo, la T3 no tuvo ningún efecto en la línea celular PC-3 (cáncer prostático invasivo) (Zhang et al., 1999; Hsieh et al., 2005; Tsui et al., 2008), pero un estudio en ratones inmunosuprimidos implantados con estas células, muestra que la T4 estimula el crecimiento tumoral (Theodossiou et al., 1999).

4. INTERACCION DE HORMONAS TIROIDEAS CON LA VIA β -ADRENÉRGICA

Las HT y la activación β -adrenérgica regulan procesos fisiológicos y patológicos. Esta interacción opera de manera independiente y/o coordinada, estimulando o inhibiendo a diferentes niveles de sus vías de señalización. Uno de los ejemplos más estudiados es la respuesta a la exposición al frío: este estímulo activa al sistema nervioso simpático (locus coeruleus y núcleo del tracto solitario) y al eje hipotálamo-hipófisis-tiroides a través del núcleo paraventricular e inervación directa de la tiroides (ganglio cervical superior). La estimulación simpática del tejido adiposo activa a los receptores β adrenérgicos, y se induce la expresión del gen de la proteína descopladora-1 (a través de elementos de respuesta a cAMP [CRE]), la cual produce calor como respuesta final (Silva y Rabelo, 1997). Por otra parte, la estimulación simpática induce la generación local de T3 (activación de la D2), y esta hormona, por mecanismos nucleares (a través de TREs), induce la expresión de esta proteína. El incremento en la expresión de este gen no sólo se lleva a cabo por separado por ambos sistemas (adrenérgico y tiroideo), sino que hay un sinergismo, en el que la T3 activa una región “enhancer” que amplifica la expresión de este gen en respuesta a la estimulación simpática (Rabelo et al., 1995). Aunado a esto, las HT amplifican la respuesta β -adrenérgica a nivel de incremento en el número de receptores y acumulación de cAMP (Silva y Bianco, 2008). En el caso contrario, como es el caso del ayuno, ambos sistemas disminuyen su actividad: disminución del tono simpático y recambio de noradrenalina, y e inhibición del metabolismo periférico de las HT por la conversión hepática de T4 a T3 e incremento de la rT3 (Young y Landsberg, 1997).

Por otro lado, esta interacción cambia cuando uno de estos dos sistemas se encuentra desajustado. Por ejemplo, en condiciones de hipotiroidismo, se ha visto que el tono simpático está incrementado (aumento en niveles de catecolaminas), pero las respuestas adrenérgicas están disminuidas. Esto puede ser explicado por una menor cantidad de receptores β -adrenérgicos, pero una mayor cantidad de receptores α_1 -adrenérgicos, los cuales inducen respuestas inhibitorias (a través de las subunidades de las proteínas $G_{\alpha i}$, o $G_{\alpha q}$) a adenosina, probablemente hay una actividad incrementada de la fosfodiesterasa, y la falta de acumulación del cAMP asociado a la falta de T3, afecta la expresión génica dependiente de esta vía de señalización (Silva, 2000).

En el caso del hipertiroidismo, ocurre lo contrario: el tono simpático se encuentra disminuido; sin embargo, aunque los niveles plasmáticos o el recambio de catecolaminas no se ven afectados, ocurren hiper-respuestas, las cuales se explican a continuación.

La T3, además de regular directamente la expresión del receptor β 2-adrenérgico a través de un elemento TRE (Jiang y Kunos, 1995), también puede modular su señalización a diferentes niveles. Por un lado, aumenta la actividad de la subunidad estimuladora de las proteínas G (G_s); y por otro, disminuye la expresión y actividad de las subunidades inhibitoras ($G_{\alpha i}$, $G_{i2\alpha}$ y G_{β}) (Rapiejko et al., 1989; Bahouth, 1995; Adli et al, 1997). También puede estimular directamente la actividad de la adenilato ciclasa y todo esto, converge en una mayor producción de cAMP (Segal et al., 1985; Silva y Bianco, 2008).

A nivel génico, el complejo T3-receptor/TRE y el complejo cAMP-pCREB/CRE sinergizan entre sí, al reclutar cada complejo su maquinaria transcripcional, y en conjunto al activar regiones “enhancer” para amplificar la expresión de genes en respuesta a cAMP, como se explicó anteriormente. Esto se ha reportado en genes relacionados a gluconeogénesis (fosfoenolpiruvato carboxi-cinasa, PEPCK), o a termogénesis (proteína desacopladora 1, ucp-1). (Giralt et al., 1991., Silva y Rabelo, 1997; Hanson y Reshef, 1997).

Por otro lado, se ha mostrado un antagonismo entre el complejo T3-receptor y la señalización β -adrenérgica. Existe la evidencia de que el complejo T3-receptor puede interactuar con CREB (proteína-proteína), inhibir la fosforilación de CREB por PKA y consecuentemente reprimir la expresión de genes dependientes de CRE (Sánchez-Pacheco et al., 1995; Méndez-Pertuz, et al., 2003; Fukuyama et al., 2006; Chen et al., 2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la literatura, está bien establecido que la próstata tumoral responde a señales adrenérgicas y tiroideas. La activación sostenida de los receptores β -adrenérgicos favorece la progresión del cáncer (adquisición del fenotipo neuroendócrino y aumento en la capacidad invasiva); sin embargo, los efectos de las HT han sido menos estudiados.

Por un lado, se sabe que la T4 y la T3 estimulan la proliferación de las células de cáncer prostático; y que en otros tipos de cáncer, la T4 promueve la progresión tumoral a través de incrementar la angiogénesis, sobrevivencia celular e invasión. Específicamente, en la próstata se ha observado que un aumento en la generación prostática de T3 está asociado con un menor índice de lesiones cancerosas. Aunque en varios modelos, se ha mostrado que la T3 puede potenciar o inhibir la respuesta β -adrenérgica; en el cáncer prostático, los efectos de esta interacción no han sido explorados. Así, el propósito de este estudio fue evaluar la participación de las HT y de los receptores β -adrenérgicos, en la iniciación y progresión tumoral.

HIPÓTESIS

La estimulación β -adrenérgica y la T4 favorecerán, y la T3 atenuará la progresión prostática tumoral.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Analizar en modelo *in vivo* e *in vitro* los efectos de la estimulación β -adrenérgica y hormonas tiroideas en la progresión del cáncer de próstata.

2. Objetivos particulares

2.1 Analizar la participación de los receptores β -adrenérgicos y T3 sobre la incidencia, crecimiento y progresión tumoral en un modelo de ratón inmunosuprimido.

2.2 Analizar la participación de los receptores β -adrenérgicos, T4, y T3 en la adquisición de fenotipo neuroendócrino, secreción de VEGF y capacidad invasiva, en células humanas de cáncer prostático poco invasivas (LNCaP) e invasivas (DU145).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

T4, T3, anticuerpo anti T3 e Isoproterenol (sal bitartrato) fueron obtenidos de Sigma (St. Louis MO, USA). ^{125}I -T3 (1200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) fue obtenida de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA). El kit de inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección total de T3 fue comprado en Immuno-Diagnostics (Foster City, CA, USA). Los pellets de ISO fueron obtenidos en Innovative Research of America (Sarasota FL, USA). El matrigel y las cámaras de invasión con matrigel fueron de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). Los anticuerpos contra SYP (H-03), VEGF (SPM 225), CREB (240), pCREB (Ser 133, 7978) y cabra-anti conejo y cabra-anti ratón acoplados a IgG-HRP (fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). La solución bloqueadora de peroxidasas y el tetrahidrocloruro 3,3'-diaminobencidina (DAB) fueron adquiridos en Dako (Glostrup, Dinamarca). Las membranas de nitrocelulosa fueron obtenidas de BioRad (Hercules, CA, EUA), y el sistema de detección quimioluminiscente ECL fue de Amersham (GE Healthcare, RU). El kit de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para VEGF humano se adquirió de Abcam (Cambridge, MA, EUA). Los demás reactivos utilizados en este estudio fueron obtenidos de la mayor pureza disponible comercialmente. Las líneas celulares humanas de cáncer de próstata fueron obtenidas directamente de ATCC (Manassas, VA, EUA).

2. MODELOS BIOLÓGICOS

Se utilizaron ratones machos C57-BL y ratones inmunosuprimidos de la cepa nu/nu, los cuales presentan una mutación en el gen *Foxn1*, que les causa distrofia atímica y alopecia (Pantelouris, 1968). Los ratones se mantuvieron en cajas de acrílico con filtro, a temperatura constante (22 ± 1 °C) e iluminación controlada (oscuridad 18:00 – luz 06:00). Tuvieron acceso *ad libitum* al agua y alimento. Los animales fueron sacrificados por decapitación (este protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del INB-UNAM, bajo los lineamientos de la edición mexicana de la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council).

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer prostático: LNCaP y DU 145 de origen humano. Las células LNCaP provienen de una metástasis de carcinoma prostático a nódulo linfático, son responsivas a los andrógenos, expresan marcadores de diferenciación y son poco invasivas (Horoszewicz et al. 1983). Las células DU145 provienen de una metástasis a cerebro, no responden a los andrógenos y son altamente invasivas (Stone et al., 1978).

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 Efecto de la estimulación β -adrenérgica y/o T3 en tumores prostáticos de origen humano (LNCaP), generados en ratones inmunosuprimidos. Incidencia, crecimiento y progresión tumoral

Se cultivaron células LNCaP y se inocularon de manera subcutánea (5.5 millones suspendidas en 100 μ l de medio y 100 μ l de matrigel) en ratones inmunosuprimidos (nu/nu) de 8 semanas de edad. A un grupo se le administró el agonista β -adrenérgico ISO (200 μ g/día), mediante un pellet de liberación controlada. (Thaker et al., 2006). Otro grupo fue tratado con T3 en el agua de beber (2.5 μ g por día), y otro grupo tuvo un tratamiento combinado (ISO+T3). Las dosis utilizadas de estos tratamientos fueron ensayadas en otros estudios y no comprometen la salud de los animales. La dosis de ISO aumenta la frecuencia cardíaca pero no la presión arterial, mientras que la dosis de T3 induce un hipertiroidismo subclínico, pero no franco (Berthonneche et al., 2009; Henderson et al., 2009). Los tratamientos tuvieron una duración de 6 semanas, durante las cuales se registró el peso corporal y el tamaño tumoral. El volumen tumoral se calculó a partir de la fórmula de la elipsoide (Thompson, 2000). En el momento del sacrificio, se colectó la sangre para obtener el suero y se registró el peso del tumor; se midieron los niveles séricos y tumorales de T3. Parte de los tumores se procesaron para el análisis histológico (inmunohistoquímica) y molecular (expresión génica).

3.2 Efecto de la estimulación β -adrenérgica, T3 y/o T4 sobre la formación de procesos tipo neurita, secreción de VEGF y capacidad invasiva, en células humanas de cáncer prostático LNCaP (poco invasivas) y DU145 (invasivas)

Las células LNCaP y DU145 se cultivaron en medio RPMI-1640 sin rojo fenol y DMEM respectivamente. Ambos medios fueron adicionados con suero fetal bovino (5%) tratado con carbón (bajo en hormonas), penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 μ g/ml) a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂. Se cultivaron 20 000 células, y al día siguiente de su siembra se cambió el medio con su respectivo tratamiento disuelto en

su medio correspondiente. Los tratamientos fueron ISO 50 μ M, T3 10 nM, T4 100 nM y la respectiva combinación de ambos por 6 días para las células LNCaP y 4 días para las células DU145. Se cuantificó el número y longitud de procesos tipo neurita (microscopía de contraste de fases), la secreción de VEGF (ELISA) y la capacidad invasiva de las células (ensayo transwell). En algunos experimentos se evaluó los niveles de CREB total y fosforilado (immunoblotting).

4. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

4.1 Cuantificación de niveles séricos y tumorales de T3

Los niveles séricos de T3 se midieron por radioinmunoensayo homólogo. Esta técnica se basa en la ley de acción de masas de la reacción antígeno-anticuerpo, y consiste en poner a competir el antígeno marcado ($^{125}\text{I-T3}$) con la hormona no marcada (T3), contenida en los estándares o en la muestra problema. Se incubaron 50 μl de suero. El anticuerpo a T3 se utilizó a una dilución 1:2000 y 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 – dextran (0.5%). La solución se centrifugó a 2500 rpm, durante 30 minutos (4°C). Se cuantificó la radioactividad obtenida en la fracción unida (sobrenadante) y libre (botón). La curva estándar se construyó en un intervalo de 4 a 500 pmol T3 / 100 μl . Los resultados se expresan como ng de T3/dl de suero.

Los niveles tumorales de T3 se midieron mediante inmunoensayo enzimático (EIA). La extracción de T3 de los tejidos se realizó de la siguiente manera: Las próstatas se pesaron y se homogenizaron en metanol y PTU (1mM) en una proporción 1:4 (p/v). El homogenizado se centrifugó a 3,000 rpm, durante 10 minutos (4°C) y el sobrenadante se evaporó a 65°C. El precipitado se resuspendió en 200 μl suero hipotiroideo. El coeficiente de recuperación de la extracción de T3 fue de 75%. El ensayo contenía la muestra o estándares (0.75 to 10 ng T3/ml) y anticuerpo anti T3 conjugado a peroxidasa de rábano en un volumen final de 200 μl . Se incubó esta mezcla 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó tetrametilbenzidina y 20 minutos después la reacción se detuvo con ácido clorhídrico. Se midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados se expresan como ng T3/ g tejido.

4.2 Análisis de la expresión génica

La extracción, precipitación y purificación de RNA se realizó homogenizando el tejido prostático en trizol en una proporción 1:10 p/v. El tejido homogenizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. La extracción del RNA se realizó con 200 μl de cloroformo. La mezcla se centrifugó (12000 rpm a 4°C) durante 20 minutos, y la fase acuosa se mezcló con 500 μl de isopropanol para precipitar el RNA. El RNA se lavó con 1 ml de etanol (75%), se resuspendió en 100 μl de agua estéril, y se almacenó a -

70°C. La cuantificación de RNA, se realizó en un espectrofotómetro UV a 260 nm y la pureza se determinó con el cociente de absorbancia 260/280 nm.

La síntesis del cDNA se realizó a partir de la retrotranscripción de 2 µg de RNA. El RNA se incubó con oligo dT (50 µM), durante 5 minutos a 65°C. Posteriormente se incubó a 42°C (1 hora), con buffer (Tris HCl 200 mM a pH 8.4 y KCl 500 mM), DTT (0.1 M), inhibidor de RNasas RNasin (40 u/µl), dNPTs (10 pmoles) y enzima Superscript II. Esta incubación fue seguida de otra a 55°C por 20 minutos.

La temperatura óptima de amplificación de los oligonucleótidos se determinó mediante un gradiente de 55-65°C. Posteriormente, se corroboró el tamaño y especificidad del producto de amplificación, observando una sola banda del tamaño esperado en un gel de agarosa al 3%. En la Tabla 1 se resumen las secuencias, tamaño y temperatura de alineación de los oligonucleótidos utilizados. La expresión génica se analizó a partir de 2 µg de RNA total mediante PCR (tiempo real), utilizando Máxima SYBR Green y los oligos específicos (10 pM). El perfil de amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: Hold a 95°C 2 min. Ciclos (35 a 40) que incluyeron desnaturalización (95°C por 15 seg), alineación (55-64°C 15 segundos) y extensión (72°C 15 seg). Finalmente, se analizó la curva de disociación (rampa de 72-95°C durante 3 minutos). La expresión génica relativa se calculó usando una curva estándar y normalizada con la expresión de β-actina.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real

Gene		No. GenBank (NM_)	Sentido	Antisentido	Tamaño (bp)	Temperatura de alineamiento (°C)
Constitutivo	β -Actina	001101	ACAGAGTACTTGC GCTCAGGA	CCATCATGAAGTG TGACGTTG	185	60
Biodisponibilidad y acción de HT	MCT-8	006517	GCGCTACTTCACC TACGGGA	CAGACACCACACC ATTGGC	125	60
	D1	000792.5	TTGGGAGTTTATC GAAGTAATAGG	TGGAACTAAAGTC TTCAATAAGCCTC TT	165	60
	D3	001362.3	TGAGACTCCTGGG GAATGAC	CAGCAGCTCGCCT AGGACT	110	60
	TR- β 1	001128177	ATGACTCCCAACA GTATGACAG	TCCAGTCGTGTTT TCGGTCT	65	60
	ARA 70- α	01145260	TGCCATTGGTCTT CAGGCTCCT	CAGGCATCGCTGA AGAAACTGC	124	60
Epitelio prostático	RA	001011645	GGAATTCCTGTGC ATGAAA	CGAAGTTCATCAA AGAATT	84	55
	ADR- β 2	000024.5	GGCAGCTCCAGAA GATTGAC	GTCTTGAGGGCTT TGTGCTT	139	60
Fenotipo neuroendócrino, angiogénesis e invasión	p27 ^{kip}	004064.3	ATGTCAAACGTGC GAGTGTC	TCTGTAGTAGAAC TCGGGCAA	262	60
	Survivina	01012270.1	GATTTGAATCGCG GGACCC	GATTTGAATCGCG GGACCC	64	55
	CgA	001275.3	TGAACAGCCCTAT GAATAAA	GATGAACTCTCAG AGGTTCTTGAG	260	60
	NSE	001975.2	TGTGGTGGAGCAA GAGAACTGGA	TTGGTGGCATCCT TGCCGTATTTG	345	60
	VEGF	001025368	GGCCTCCGAAACC ATGAACTTTCTGC T	CCTCCTGCCCGG CTCACCCGC	165	60
	uPA	01145031.1	GTGGCCAAAAGAC TCTGAGG	CAAGCGTGTCAGC GCTGTAG	267	64
	MMP-9	04994.2	TGG TCC TGG TGC TCC TGG TG	GCTGCCTGTCGGT GAGATTGG	111	60

MCT8 = Transportador de monocarboxilatos-8; **D1** = Desyodasa 1; **D3** = Desyodasa 3; **TR- β 1** = Receptor de TH β 1; **ARA 70- α** = Coactivador del receptor de andrógenos 70- α ; **RA** = Receptor de andrógenos; **ADR- β 2** = Receptor adrenérgico β 2; **p27^{kip}** = Inhibidor dependiente de ciclina, **CgA**= Cromogranina A; **NSE** = Enolasa neuronal específica **VEGF** = Factor de crecimiento endotelial vascular; **uPA** = Urokinasa activadora de plasminógeno; **MMP-9** = Metaloproteínasa-9.

4.3 Inmunohistoquímica para detectar la presencia de SYP y VEGF

Los tejidos fueron fijados con formalina (10%) en buffer de fosfatos, y fueron procesados para inclusión en parafina. Secciones de tumores fueron desparafinizadas

y rehidratadas. La exposición del antígeno fue realizada usando una solución de anhídrido citracónico 0.05% a pH 7.4 colocado en olla de presión por 25 minutos. Los cortes se bloquearon con solución de bloqueo de peroxidasas, y se incubaron a 4°C toda la noche con anticuerpo anti-sinaptofisina o anti-VEGF, ambos a una dilución de 1:100. Se incubaron posteriormente con anticuerpo secundario (anti-conejo IgG-HRP o anti ratón-IgG-HRP) a una dilución de 1:1000 a 37°C por una hora. La visualización de SYP y VEGF fue realizada con diaminobencidina (DAB). Los cortes se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con Entellan. Cortes de médula adrenal se procesaron y se usaron como control positivo. Cortes histológicos incubados sin anticuerpo primario fueron usados como control negativo. Las imágenes se adquirieron y analizaron por microscopía de luz a una magnificación de 100X. Este análisis fue realizado en colaboración con la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie.

4.4 Morfología de tipo neuroendócrino

Se analizó la longitud y número de proyecciones tipo neurita, características de las células neuroendócrinas, por microscopía de contraste de fases a 20X, en cuatro campos aleatorios. Las imágenes se analizaron con el software Infinity Capture e Infinity Analyze.

4.5 Niveles y secreción de VEGF

La secreción de VEGF al medio de cultivo fue cuantificada por el método de ELISA. Se utilizó un anticuerpo monoclonal biotinilado (conjugado con HRP-estreptavidina) que detecta las isoformas 165 y 121 de VEGF. Los resultados se interpolaron con una curva de calibración de VEGF (8 a 6000 pg/ml). El contenido de proteína total en el medio fue medido por el método de Bradford. Los datos se expresaron como pg de VEGF / mg de proteína.

4.6 Invasión celular

Se analizó mediante el uso de cámaras de invasión, las cuales contienen una membrana de PET (tereftalato de polietileno), sobre la cual se encuentra una capa de matrigel (Figura 5). Las células LNCaP o DU145 se sembraron a una densidad de 25 000 células/pozo y fueron tratadas por 6 ó 4 días respectivamente, con ISO (50 µM), T3 (10 nM), T4 (100nM), ISO+T3 e ISO+T4. La cámara inferior contenía medio completo como quimioatrayente. Después de 36 horas de incubación, la base de cada

pozo se limpió con un hisopo, se fijó con metanol y se tiñó con azul de toluidina 1% en borax 1%. El número de células invasivas se contó en cuatro campos aleatorios por pozo en un microscopio de luz a 20X, usando el software Image J 1.43u. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

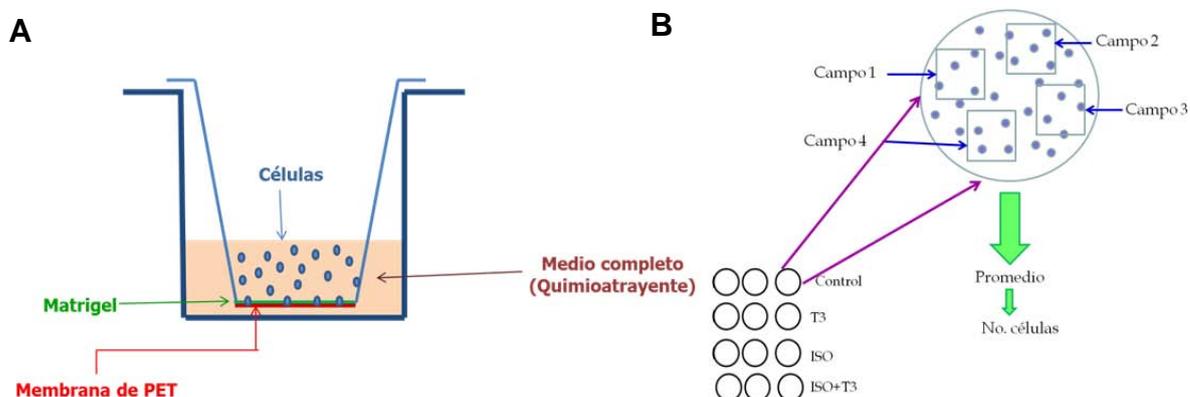


Figura 5. Representación de un ensayo de invasión (A). Análisis del número de células que migraron por la matriz de matrigel (B).

4.7 Expresión de CREB total y fosforilado

Las células se homogenizaron con buffer RIPA (Tris HCl pH7.4 50 mM, NP-40 0.5%, NaCl 100mM) e inhibidor de proteasas mini Complete sin EDTA. Se centrifugaron a 12000 rpm 10 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford. La detección de CREB y pCREB se llevó a cabo por Western Blot usando tejido adiposo café como control positivo. Los extractos proteicos (25 ó 50 µg de proteína) se resolvieron por SDS-PAGE 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por electroblot. Las membranas se lavaron con TBS (buffer Tris salino pH 7.5) 10 minutos y bloqueadas con T-TBS (TBS-Tween 20 0.05%) y leche en polvo al 5% por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces por 10 minutos con T-TBS e incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (CREB o pCREB), ambos a una dilución 1:1000. Las membranas se lavaron nuevamente 3 veces 10 minutos con TTBS, y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-conejo IgG a una dilución 1:5000. La detección de las proteínas se llevó a cabo usando el sistema ECL de quimioluminiscencia. El análisis densitométrico se realizó mediante el programa Image J 1.43u. Se realizaron 3 experimentos independientes.

4.8 Estadística

Todos los datos representan la media \pm error estándar ($X \pm E.E$). La incidencia tumoral fue analizada mediante chi-cuadrada (X^2). La homogeneidad de varianzas fue determinada por la prueba de Bartlett y Brown-Forsythe. Los datos con distribución normal fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías y prueba post-hoc de Tukey. Los datos con distribución no paramétrica se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis y prueba post-hoc de Dunn's. Las diferencias significativas fueron consideradas cuando $p < 0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Graph Pad Prism 6.

RESULTADOS

1. Efecto de la estimulación β -adrenérgica y/o T3 sobre la progresión de tumores prostáticos de origen humano (LNCaP), generados en ratones inmunosuprimidos

1.1 Peso corporal, incidencia y crecimiento tumoral

Los resultados de la Figura 6 muestran que ninguno de los tratamientos afectó el peso corporal (A), pero modificaron la incidencia (B) y el crecimiento tumoral (C). Los datos muestran que el 100 % de los ratones del grupo control y los tratados con ISO solo o combinado con T3 desarrollaron tumores, mientras que el 85 % de los animales tratados con T3 los desarrollaron. Los grupos tratados con ISO e ISO+T3 mostraron una latencia en la aparición de los tumores de 2 semanas, mientras que en el grupo control y T3, los tumores aparecieron en la tercera semana. En la figura 5C se observa un rápido crecimiento tumoral entre la cuarta y sexta semana del grupo control. En contraste, el ISO, T3 e ISO+T3 mostraron un crecimiento tumoral más lento, mostrando un tamaño tumoral reducido después de 6 semanas de tratamiento. El crecimiento más lento fue observado en ambos grupos de ISO.

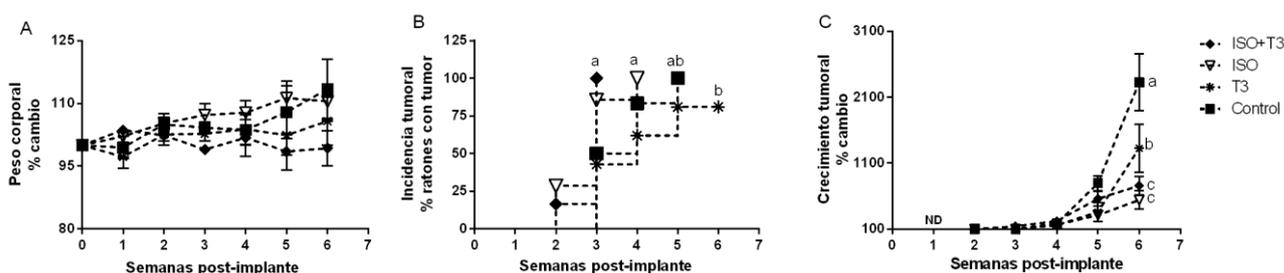


Figura 6. Efecto de la administración de ISO, T3 y de ambos en el peso corporal (A), incidencia (B) y crecimiento tumoral (C). Los datos se analizaron con chi cuadrada, ANOVA de dos vías, y prueba post-hoc de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$. $n = 6$ animales por grupo.

1.2 Niveles de T3 y expresión génica asociada a la respuesta tiroidea

1.2.1 Cuantificación de los niveles séricos y tumorales de T3

En la Figura 7 se muestra que la administración de ISO no modificó los niveles séricos (A) y tumorales (B) de T3, pero la suplementación con T3 incrementó ambos parámetros entre un 20 y 30%, comparados con el grupo control.

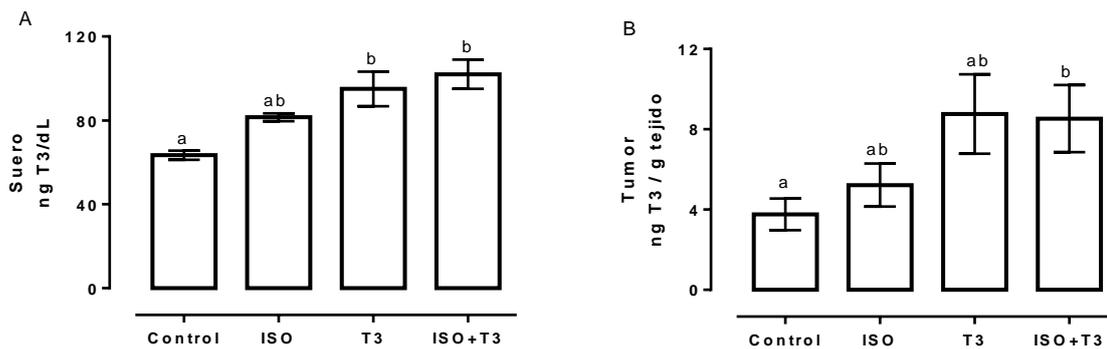


Figura 7. Niveles séricos (A) y tumorales (B) de T3. Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$. $n = 6$ animales por grupo.

1.2.2 Expresión génica asociada a la respuesta tiroidea

La Figura 8 muestra los efectos de los tratamientos en la expresión de genes asociados a biodisponibilidad y respuesta a T3 en el tejido tumoral: Transportador monocarboxilato 8 (MCT-8, A), desyodasa tipo 1 (D1, B), desyodasa tipo 3 (D3, C), el receptor nuclear a hormonas tiroideas TR- β 1 (D) y un gen de epitelio prostático responsivo a T3 (proteína asociada al receptor de andrógenos 70, ARA70 α). En comparación con el grupo control, el ISO redujo significativamente la expresión de D3 en un 60 %, pero no tuvo efecto en el resto de los genes. El tratamiento con T3 incrementó la expresión de D1 y ARA70 α de un 40 a un 50 %, pero no tuvo ningún efecto en la expresión de MCT-8 o D3. Comparado con el grupo control, una disminución evidente pero no significativa del receptor TR- β 1 (60 %) fue observada en respuesta a T3. En el grupo combinado (ISO+T3), la baja expresión de D3 fue consistente con la reducción mediada por ISO. Por otro lado, el ISO antagonizó la disminución observada en el receptor TR- β 1 asociada con T3, pero no ejerció este efecto antagónico en la expresión de ARA70 α .

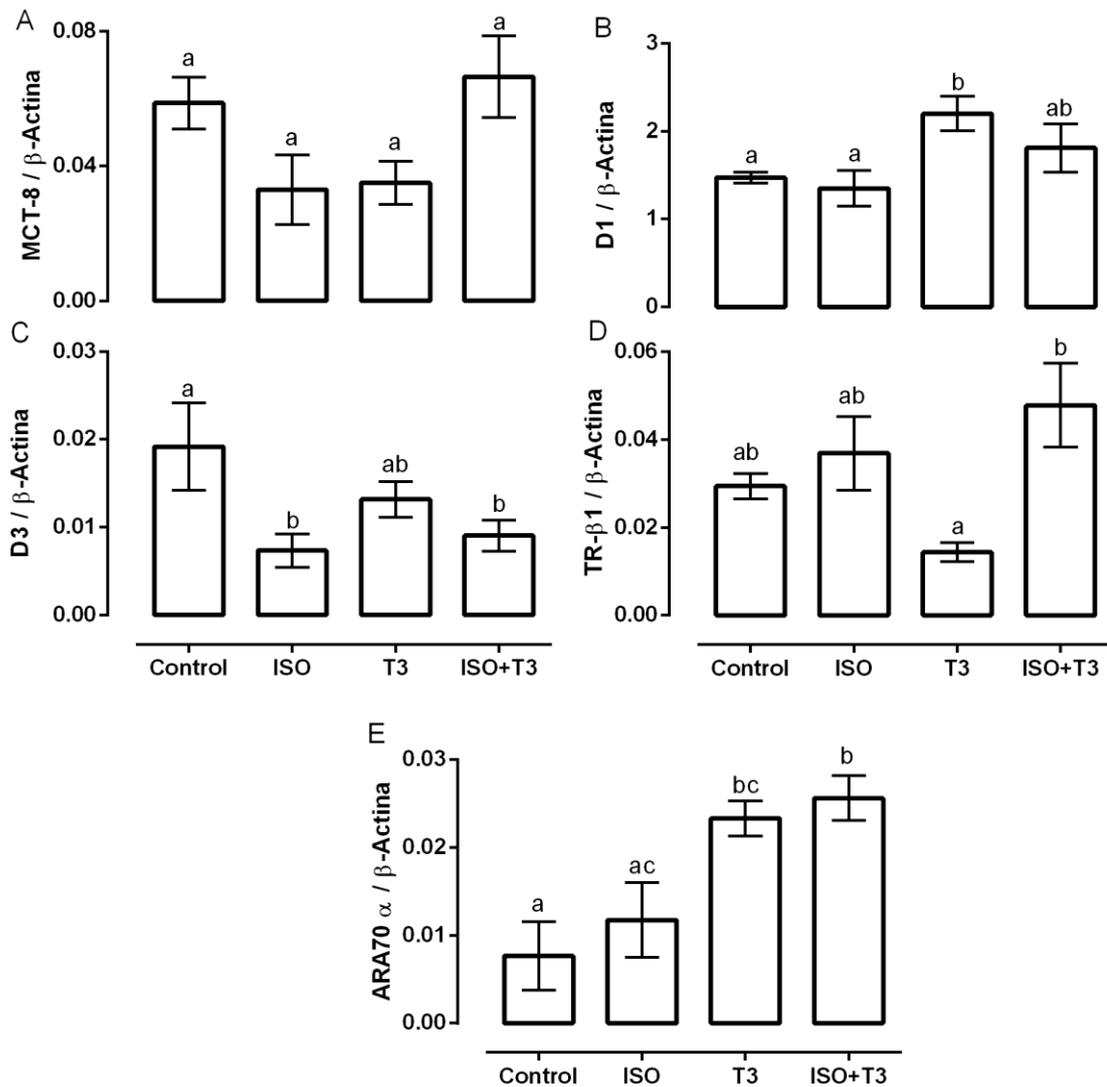


Figura 8. Expresión génica asociada a T3. Genes relacionados con transporte (A), metabolismo y disponibilidad de T3 (B y C), receptor nuclear (D) y (E) de la respuesta tiroidea. Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$. $n = 6$ animales por grupo.

1.3 Expresión génica asociada a fenotipo neuroendócrino e invasión

1.3.1 Genes de epitelio prostático

En la Figura 9A y 9B se muestra la expresión de genes característicos de epitelio prostático: el receptor de andrógenos (RA), y el receptor β adrenérgico tipo 2 (ADR- β 2). Se observó que el ISO incrementó la expresión del RA y disminuyó la del receptor ADR- β 2. La T3 por sí sola no tuvo efecto en la expresión de ninguno de estos dos genes, pero en el grupo combinado, la T3 previno el incremento y disminución de la expresión del RA y del receptor ADR- β 2 respectivamente, asociado al ISO.

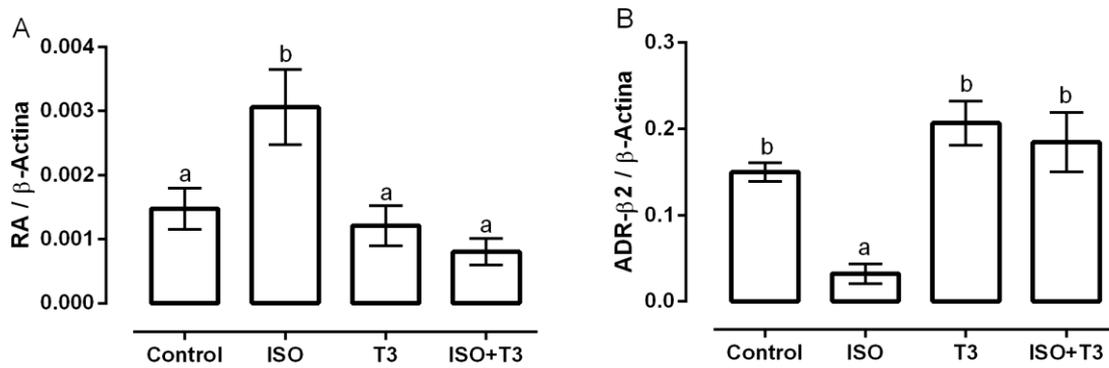


Figura 9. Expresión de genes de epitelio prostático: el receptor de andrógenos (A) y el receptor β -adrenérgico tipo 2 (B). Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$. $n = 6$ animales por grupo.

1.3.2 Genes asociados al fenotipo neuroendócrino

La Figura 10 muestra la expresión de genes asociados a fenotipo neuroendócrino. Se evaluó la expresión de $p27^{kip}$ (A), survivina (B) y dos péptidos secretados por células neuroendócrinas, CgA y NSE (C). Se puede observar que el ISO incrementó al doble o triple la expresión de survivina, CgA y NSE comparados con el grupo control. El increment en $p27^{kip}$ no fue significativo. La T3 por sí sola no modificó la expresión de estos genes, pero previno los incrementos inducidos por el ISO.

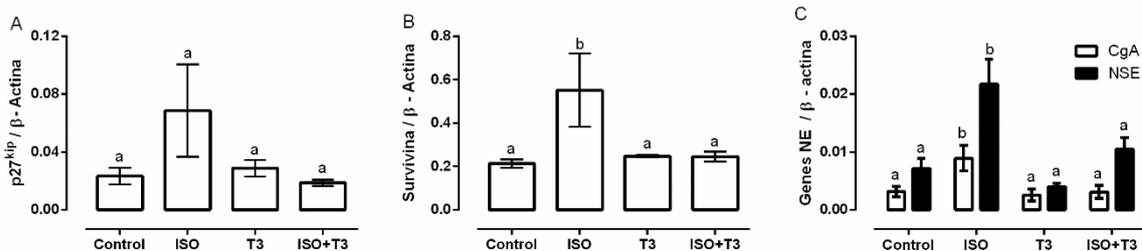


Figura 10. Expresión de genes asociados al fenotipo neuroendócrino: arresto (A), sobrevivencia (B) y péptidos (C). Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$. $n = 6$ animales por grupo.

1.3.3 Expresión de SYP como marcador de fenotipo neuroendócrino

En la Figura 11 se muestran imágenes representativas de la inmunodetección de SYP en cortes histológicos de xenotransplantes. Un número mayor de células positivas a SYP fueron observadas en tumores del grupo tratado con ISO, comparado con los grupos control o los tratados con T3. La T3 sola no afectó los niveles de esta proteína, pero previno el incremento mediado por el ISO. Una evidente

inmunodetección de ambos marcadores fue observada en el control positivo (médula adrenal), y ausencia de señal fue observada en los controles negativos.

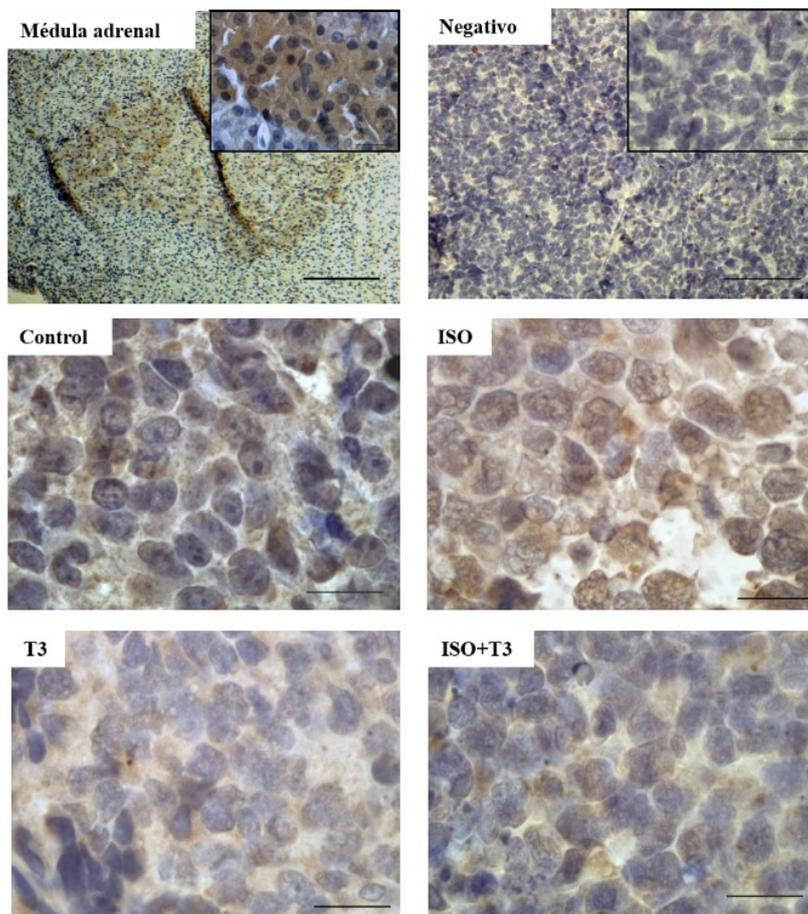


Figura 11. Expresión de SYP en tumores de xenotransplantes. Imágenes de microscopías de luz representativas que muestran la inmunodetección de SYP a una magnificación de 100X. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina. La médula adrenal fue utilizada como control positivo, y un xenotransplante incubado con PBS en lugar de anticuerpo secundario, fue utilizado como control negativo. Los insertos de los controles positivo y negativo son a 20X. Barra de escala, 20 micras.

1.3.4 Genes asociados a invasión

En la Figura 12 se muestra la expresión de genes asociados a progresión tumoral, que incluyen genes de angiogénesis e invasión, tales como uroquinasa activadora de plasminógeno (uPA) (A), VEGF (B) y MMP-9 (C). De manera similar a los genes asociados a fenotipo neuroendócrino, el ISO incrementó entre 2 y 3 veces su expresión, mientras que la T3 sola no tuvo ningún efecto. Nuevamente, se puede observar que la T3 previno el incremento mediado por el ISO en la expresión de estos genes.

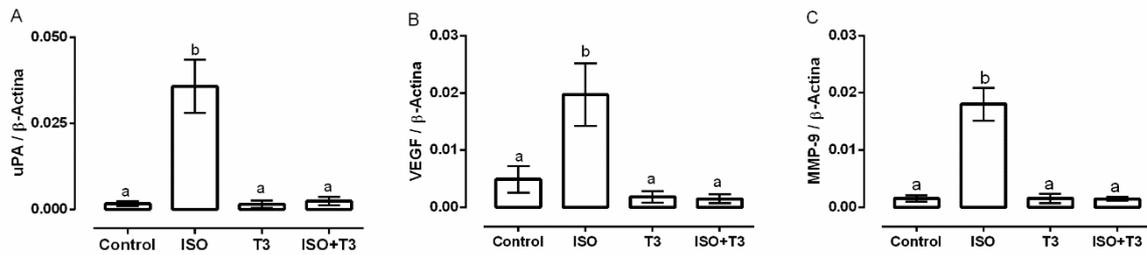


Figura 12. Expresión de genes asociados a invasión: uPA (A), VEGF (B) y MMP-9 (C). Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$. $n = 6$ animales por grupo.

1.3.5 Expresión de VEGF como marcador de progresión tumoral

En la Figura 13 se muestran imágenes representativas de la inmunodetección de VEGF en cortes histológicos de xenotransplantes. De manera similar a SYP (Figura 10), un número mayor de células positivas a VEGF fueron observadas en tumores del grupo tratado con ISO, comparado con los grupos control o los tratados con T3. La T3 sola no afectó los niveles de esta proteína, pero previno el incremento mediado por el ISO. Una evidente inmunodetección de ambos marcadores fue observada en el control positivo (médula adrenal), y ausencia de señal fue observada en los controles negativos.

2. Efecto de la estimulación β -adrenérgica, T3 y/o T4 sobre la formación de procesos tipo neurita, secreción de VEGF y capacidad invasiva, en células humanas de cáncer prostático LNCaP (poco invasivas) y DU145 (invasivas)

Con el propósito de determinar si los incrementos en expresión génica y proteica en xenotransplantes en respuesta a la estimulación β -adrenérgica están asociados a la adquisición proyecciones tipo neurita y capacidad invasiva, se llevaron a cabo experimentos en las líneas celulares de cáncer prostático LNCaP (poco invasivas) y DU145 (invasivas). Asimismo, se incluyó un grupo tratado con T4, para discernir los efectos de ambas tironinas en estos procesos.

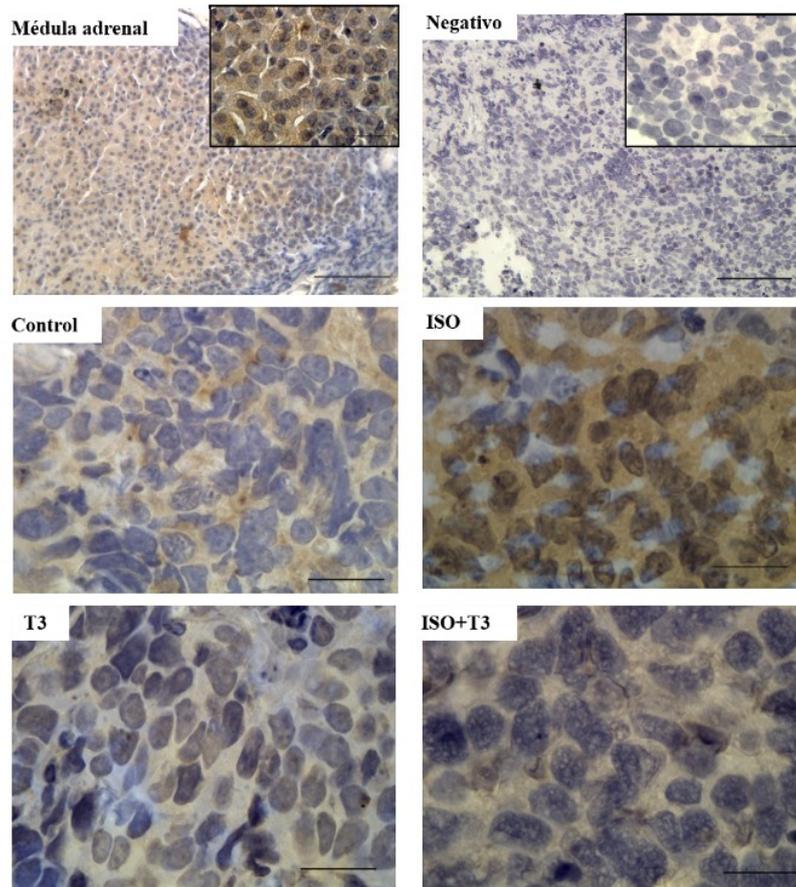


Figura 13. Expresión de VEGF en tumores de xenotransplantes. Imágenes de microscopías de luz representativas que muestran la inmunodetección de VEGF a una magnificación de 100X. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina. La médula adrenal fue utilizada como control positivo, y un xenotransplante incubado con PBS en lugar de anticuerpo secundario, fue utilizado como control negativo. Los insertos de los controles positivo y negativo son a 20X. Barra de escala, 20 micras.

2.1 Morfología de tipo neuroendócrino

2.1.1 Células LNCaP

En la Figura 14 se muestran imágenes de microscopía por contraste de fases (A) con los respectivos tratamientos, así como la longitud (B) y procesos tipo neurita por célula (C). Se puede observar que tanto el ISO como la T4 incrementaron de 30 a 40% la longitud y número de procesos neuríticos. A diferencia de la T4, la T3 no modificó por sí sola estos parámetros, pero previno el incremento inducido por la administración del ISO.

A

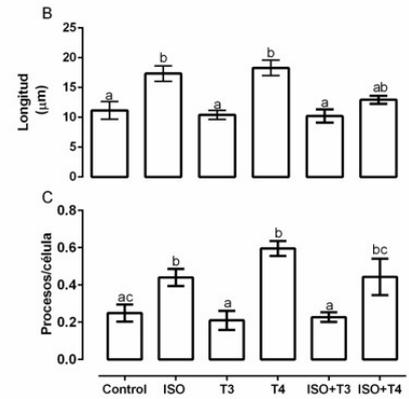
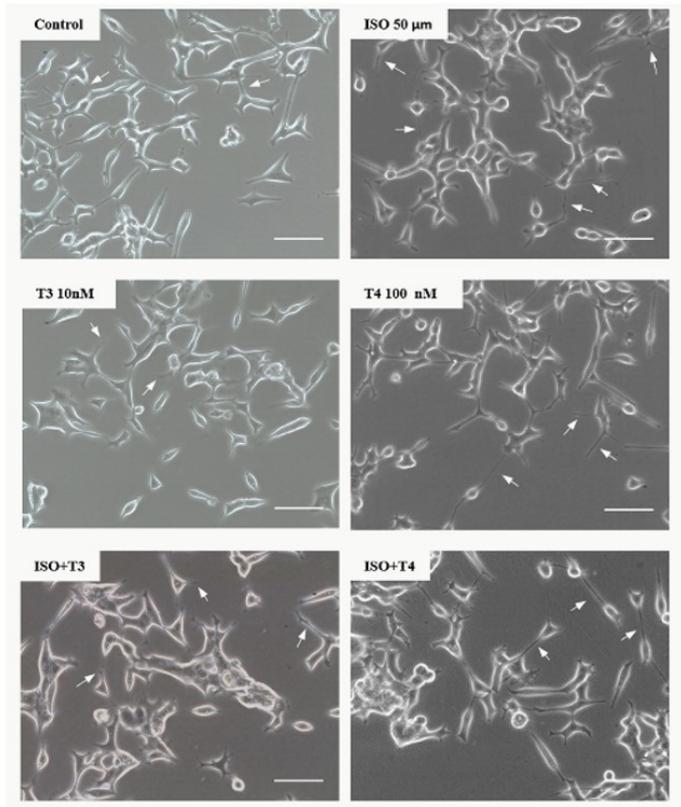


Figura 14. Fotomicrografías representativas de las proyecciones tipo neurita (A), longitud (B) y número de procesos (C) en células LNCaP. Las células fueron tratadas por 6 días con ISO 50 μM , T3 10 nM o T4 100 nM y su respectiva combinación con ISO. Imágenes representativas por contraste de fase a 20X. Barra de escala, 50 micras. Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey. n = 4-5 experimentos independientes.

2.1.2 Células DU145

En la Figura 15 se muestran imágenes de microscopía por contraste de fases (A) con los respectivos tratamientos, así como la longitud (B) y procesos tipo neurita por célula (C). Se observa que ninguno de los tratamientos tuvo efecto en la longitud ni en el número de procesos tipo neurita.

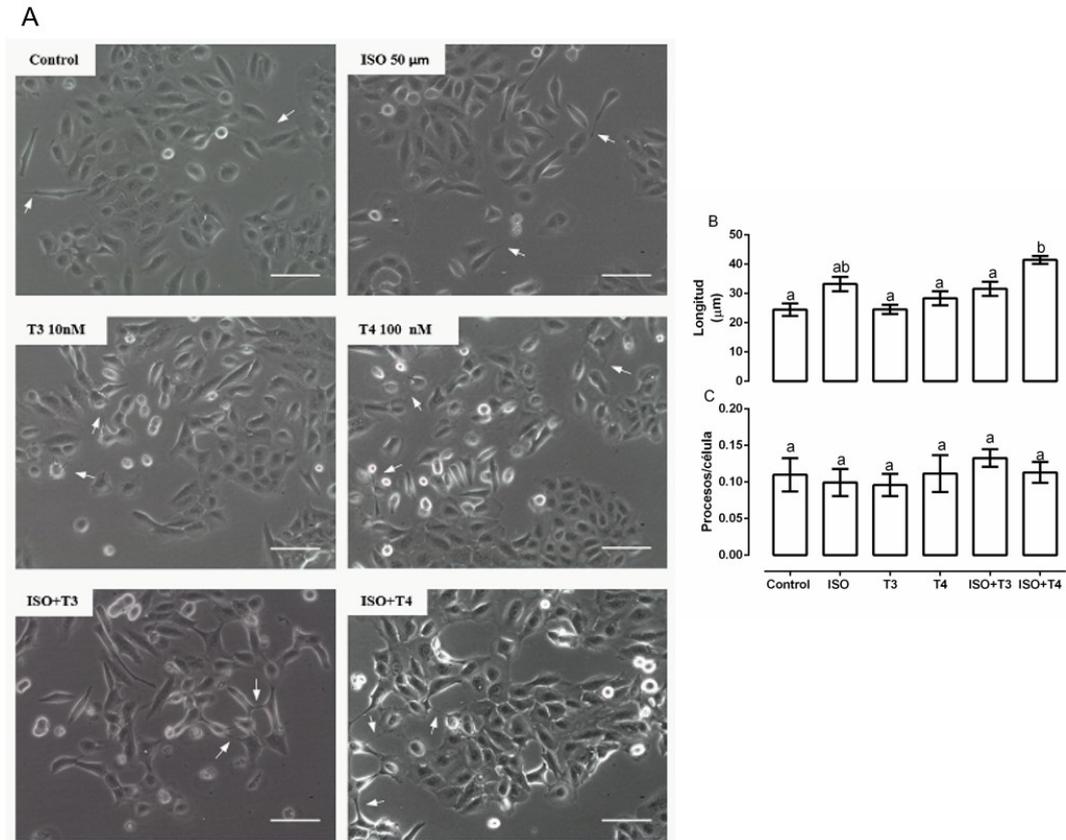


Figura 15. Fotomicrografías de las proyecciones tipo neurita (A), longitud (B) y número de procesos (C) en células DU145. Las células fueron tratadas por 4 días con ISO 50 μM , T3 10 nM o T4 100 nM y su respectiva combinación con ISO. Imágenes representativas por contraste de fase a 20X. Barra de escala, 50 micras. Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey. $n = 4-5$ experimentos independientes.

2.2 Secreción de VEGF y capacidad invasiva

2.2.1 Células LNCaP

En la Figura 16 se muestra el efecto de la estimulación β -adrenérgica y las HT en ensayos funcionales de secreción de VEGF (A) y capacidad invasiva (B) en las células LNCaP. De manera similar a la adquisición de proyecciones tipo neurita, se encontró que tanto el ISO como la T4 incrementaron la secreción de VEGF y la invasión de las células LNCaP.

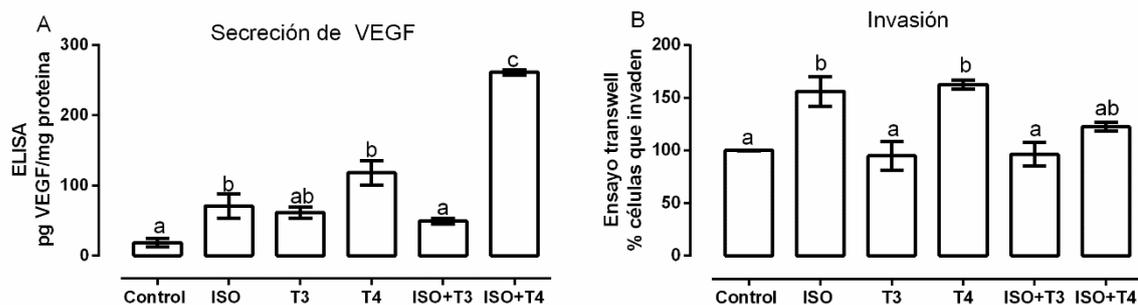


Figura 16. Secreción de VEGF (A) y capacidad invasiva (B) de las células LNCaP. Las células fueron tratadas por 6 días con ISO 50 μ M, T3 10 nM o T4 100 nM y su respectiva combinación con ISO. Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas con $p < 0.05$. $n = 4-5$ experimentos independientes.

2.2 Células DU 145

En la Figura 17 se puede observar que no hubo efecto de la β -adrenérgica y las HT en la secreción de VEGF (A) o en la capacidad invasiva (B) de las células DU145.

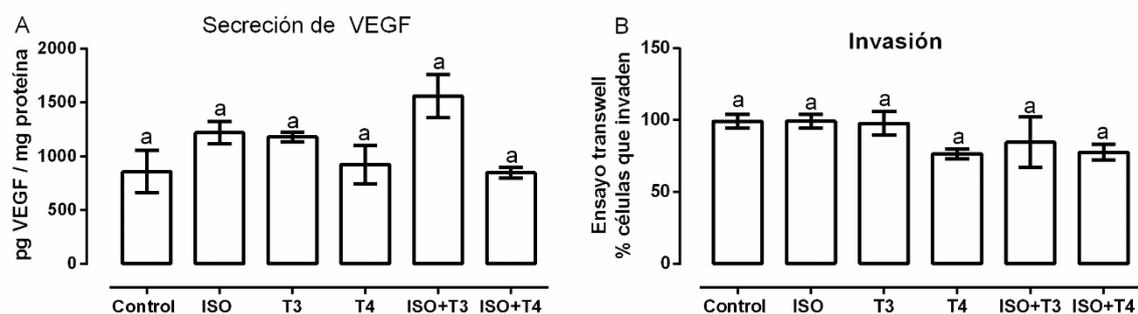


Figura 17. Secreción de VEGF (A) y capacidad invasiva (B) de las células DU145. Las células fueron tratadas por 4 días con ISO 50 μ M, T3 10 nM o T4 100 nM y su respectiva combinación con ISO. Los datos se analizaron con ANOVA y prueba post-hoc de Tukey. No se encontraron diferencias significativas. $n = 4-5$ experimentos independientes.

2.3 Fosforilación de CREB en las células LNCaP

Dado que en las células DU145 no se encontró respuesta a ninguno de los tratamientos, y en los xenotransplantes la T3 previene la expresión de genes asociados a progresión tumoral, se analizó en las células LNCaP la inmunodetección de CREB y pCREB como una primera aproximación para analizar el mecanismo por el cual la T3 reduce la capacidad invasiva de las células LNCaP. La figura 18 muestra que se encontró un incremento evidente pero no significativo en la relación pCREB/CREB en las células tratadas con ISO e ISO+T3, comparadas con el grupo control o T3.

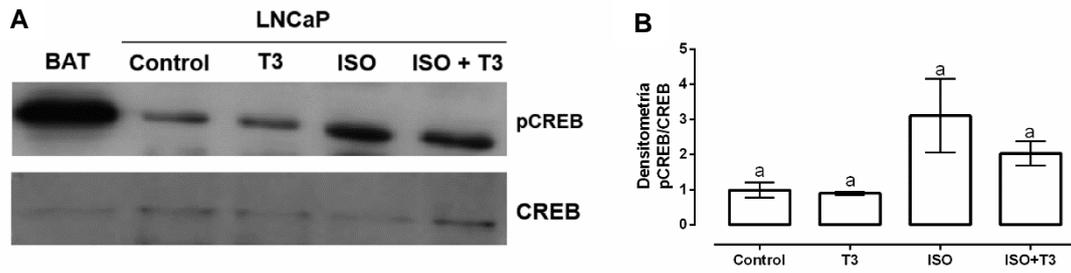


Figura 18. Fosforilación de CREB en células LNCaP. Inmunoblot representativo de la expresión proteica de pCREB y CREB (A), y su análisis densitométrico (B) en células LNCaP. Se usó como control positivo a pCREB tejido adiposo café (BAT) de ratas expuestas a frío. Los datos representan la media \pm EEM. No se encontraron diferencias significativas. n=3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Este estudio apoya la noción de que la activación β -adrenérgica sostenida promueve la progresión tumoral y la adquisición de procesos tipo neurita (neuroendócrino) e invasión en células, y que la T3, mas no la T4, tiene un importante efecto modulador en estos procesos tumorigénicos. Estos resultados son relevantes, dado que existen estudios tanto epidemiológicos como experimentales que asocian que la activación del sistema nervioso simpático por factores psicológicos-emocionales (estrés, la depresión crónica) y patológicos (hipertensión no tratada, síndrome metabólico) con la progresión de muchos tipos de cáncer, entre ellos el de próstata (Thaker et al., 2006; Armaiz-Pena et al., 2009; Hassan et al., 2013).

En ratones inmunosuprimidos xenotransplantados con células LNCaP, la activación β -adrenérgica inducida por el ISO redujo el crecimiento tumoral, pero aceleró la latencia e incidencia de tumores. Estos datos coinciden con datos de la literatura, donde muestran que el aporte simpático (vía receptores β -adrenérgicos) es crucial en la iniciación y progresión de cáncer prostático y hepático (Magnon et al., 2013; Uehara et al., 1993; Braadland et al., 2015). La disminución en el crecimiento tumoral por el ISO fue asociada con un incremento en la expresión génica asociada con arresto celular (p27^{kip}), diferenciación neuroendócrina (survivina, CgA y NSE) e invasión celular (VEGF, uPA y MMP-9) (Cox et al., 1999; Pinski et al., 2006; Xing et al., 2001; Canaff et al., 1998; Lutgendorf et al., 2003; Yang et al., 2006; Guo et al., 2009). Con excepción de VEGF y survivina, todos estos genes contienen sitios CRE (Canaff et al., 1998; Yang et al., 2006; Kwon et al., 1996; von der Ahe et al., 1990), sugiriendo una relación directa con el factor de transcripción pCREB.

Además de la expresión génica, nuestros datos mostraron una alta expresión proteica de SYP (otro marcador de diferenciación neuroendócrina) y VEGF en tumores prostáticos estimulados con ISO. Estos hallazgos correlacionan con nuestros datos *in vitro*. Un incremento en la adquisición de proyecciones tipo neurita, secreción de VEGF y potencial invasivo fueron encontrados consistentemente en las células LNCaP. Efectos duales del ISO: crecimiento tumoral disminuido e incrementada capacidad invasiva son evidencia de que los tratamientos con adrenalina o noradrenalina (por mecanismos β -adrenérgicos) reducen la proliferación, pero

promueven la adquisición de fenotipo neuroendócrino y/o invasividad en células de cáncer de próstata (Cox et al., 1999; Palm et al., 2005). En conjunto, estos hallazgos apoyan la noción de que la activación β -adrenérgica promueve la progresión del cáncer prostático incrementando la diferenciación neuroendócrina y el potencial invasivo. A nivel de mecanismos, se ha establecido que la activación de PKA y/o EPAC son procesos cruciales para la diferenciación neuroendócrina (Emery et al., 2014). PKA induce directamente la inactivación del factor apoptótico BAD (Sastry et al., 2007), y por mecanismos indirectos, PKA estimula la secreción de VEGF (vía PI3K/proteína cinasa B [Akt]/factor inducido por hipoxia 1- α [HIF1- α]) (Park, et al., 2011) y el crecimiento de neuritas por rearrreglos del citoesqueleto (inhibición de RhoA/proteína cinasa asociada a Rho [ROCK]) (Jones y Palmer, 2012). La PKA también induce la fosforilación de CREB, e induce la expresión de factores de sobrevivencia como la proteína linfoma de células B-2 (Bcl-2), metaloproteasas y péptidos neuroendócrinos como NSE, CgA, SYP, neurotensina, etc. (Cox et al., 1999; Sastry et al., 2007; Braadland et al., 2015). En esta línea, los datos obtenidos confirman una asociación entre la adquisición del fenotipo neuroendócrino y los altos niveles de pCREB en las células LNCaP tratadas con ISO. No se analizó la activación de EPAC/p38-MAPK, pero es conocido que este efector intermedio está relacionado con arresto celular en células de feocromocitoma (Emery et al., 2014).

Los hallazgos obtenidos mostraron que la responsividad a la estimulación β -adrenérgica parece ser dependiente del estado de diferenciación y/o potencial invasivo de las células de cáncer prostático. En comparación con las células LNCaP, las células altamente invasivas DU145 fueron menos sensibles a la estimulación β -adrenérgica. El ISO incrementó la secreción de VEGF, pero no el crecimiento de neuritas o capacidad invasiva. Un estudio mostró que la estimulación con dibutilil-cAMP (db-cAMP), o activadores de PKA, no promueven por sí solos la diferenciación neuroendócrina, pero incrementan la eficiencia de EGF en la inducción de este fenotipo (Humez et al., 2006). Sin embargo, esta baja responsividad contrasta con otros estudios que muestran que la activación β -adrenérgica puede incrementar o reducir la capacidad invasiva en las células DU145. Se ha reportado que el tratamiento con noradrenalina 10 μ M (en presencia de propranolol 10 μ M) estimula la migración y transición del epitelio mesenquimatoso (Barbieri et al., 2015), mientras que en otro estudio, la estimulación con ISO 100 μ M redujo la motilidad celular en un 50% (Yu et

al., 2007). Estas diferencias podrían en muy baja medida ser explicadas por la dosis y/o tiempo de exposición a los β -agonistas, y es evidente que más estudios se requieren realizar para comprender el rol de los receptores β -adrenérgicos en la invasividad de las células DU 145. No obstante, es interesante notar que a diferencia de la señalización β -adrenérgica, otras señales, como la privación de andrógenos (PI3K/AktT/MAPK) (Murillo et al., 2001), citosinas (PI3K/activadores transcripcionales de transductores de señal [STAT]) (Deeble et al., 2001), y factores de crecimiento inducen diferenciación neuroendócrina no sólo en células de cáncer de próstata de bajo potencial invasivo, sino también en las de alto (Marchiani et al., 2010; Mori et al., 2009).

Con respecto a la T3, los modelos utilizados muestran que la suplementación con esta hormona reguló positiva o negativamente la expresión de genes asociados a respuesta tiroidea, redujo el crecimiento tumoral, pero no modificó la incidencia tumoral, o la expresión basal de los genes dependientes de CRE, ni la adquisición del fenotipo neuroendócrino o capacidad invasiva. La T3 incrementó los niveles de RNA mensajero (RNAm) de D1 y ARA70, y disminuyó los de TR- β 1. Este dato no es de sorprenderse, dado que estos genes contienen secuencias TRE en sus regiones promotoras (Zhang et al., 1998; Tai et al., 2007; Suzuki et al., 1994). La actividad tumoral de la D1 no se midió, pero estudios previos han mostrado una relación directa entre la actividad enzimática (desyodación), y la generación local de T3 en la próstata (Delgado-González et al., 2011). Además, la suplementación con T3 incrementó la expresión de un gen responsivo a esta hormona (ARA70- α), el cual se encuentra reducido en células de cáncer prostático, y su sobre-expresión induce apoptosis y reduce la capacidad invasiva (Ligr et al., 2010). Los datos no nos permiten identificar un rol de la T3 en la función de ARA70, pero hay evidencia de que ARA70 podría inhibir la señalización por T3 (Tai et al., 2007). No obstante, independientemente de la regulación a la baja del gen TR- β 1, esta respuesta inhibitoria no fue observada en la expresión de la D1. Se requieren hacer estudios adicionales para entender los efectos bidireccionales de la T3 y ARA70. El crecimiento tumoral reducido asociado con T3 podría ser explicado por mecanismos indirectos, dado que estudios *in vitro* muestran que la T3 incrementa directamente la proliferación por la disminución en la expresión de un blanco de p53, la proteína BTG-2 (Zhang et al., 1999; Esquenet et al., 1995). Estudios adicionales son requeridos para entender los efectos directos o indirectos de

la T3 en el crecimiento tumoral prostático, o bien para evaluar si esta hormona previene la adquisición del fenotipo neuroendócrino inducido por otros estímulos, tales como IL-6 e IL-8 y vías de señalización activadas por estas citocinas (PI3K, cinasa Aurora A [AURKA], REST) (Santoni et al., 2014), o en genes maestros de diferenciación neuroendócrina.

En contraste a los nulos efectos de la T3, la T4 promovió el crecimiento neurítico, la secreción de VEGF y la capacidad invasiva de las células LNCaP. Estos hallazgos revelaron una falta de paralelismo entre ambas tironinas. Aunque los mecanismos moleculares de la T4 no fueron analizados en este estudio, es probable que la activación de la integrina $\alpha\beta3$ y la vía MAP cinasas median la extensión y proliferación de procesos tipo neurita, basados en las siguientes evidencias: 1) la T4 activa esta vía de señalización por interacción con el receptor de integrina $\alpha\beta3$ (Lin et al., 1999); 2) T4 100 nM, y no la T3 10 nM, induce la elongación de neuritas en neuronas cerebelares por la activación del receptor de integrina (Farwell et al., 2005); y 3) la activación de MAP cinasas es fundamental en el crecimiento de neuritas en células de feocromocitoma (Fukuda et al., 1995). Además, el incremento en la secreción de VEGF e invasividad fue observada en las células DU145 tratadas con T4. Un estudio en células de glioma tratadas con T4 100 nM incrementan los niveles de RNAm de HIF-1 α (inductor de VEGF) a través de la interacción con la vía $\alpha\beta3$ /Src/PI3K (Lin et al., 2009). Los presentes datos concuerdan con este hallazgo y sugieren que mecanismos no genómicos podrían estar involucrados en estas respuestas.

Con relación a las células DU145, los datos mostraron que la T4 ni la T3 tuvieron efectos en el crecimiento de procesos tipo neurita, secreción de VEGF o en la capacidad invasiva; no obstante, estas células también expresan las subunidades α y $\beta3$ del receptor de integrina (Witkowski et al., 1993). Se requieren realizar estudios detallados para analizar la funcionalidad del receptor $\alpha\beta3$ y su vía de señalización en estas células. Por ejemplo, se ha reportado que el reciclaje de esta integrina (mediado por proteína cinasa D) es crucial para la migración celular endotelial (di Blasio et al., 2010), y una alteración a este nivel podría explicar la falta de respuesta en las células DU145. En conjunto los datos indican que hay efectos diferenciales de las tironinas, y

que parecen depender del estado de diferenciación o de la capacidad invasiva de estas células cancerosas.

Uno de los hallazgos más importantes de este trabajo fue que la T3, mas no la T4, previno la progresión tumorogénica mediada por la estimulación β -adrenérgica en modelos con células LNCaP. Como se mencionó antes, el tratamiento con T3 no modificó la expresión basal de genes dependientes de CRE, pero previno la regulación estimulada por el ISO. En el grupo combinado, la T3 impidió el incremento en los niveles de proteínas tumorales como SYP y VEGF; e *in vitro*, previno el crecimiento de procesos tipo neurita, la secreción de VEGF y la capacidad invasiva. En varios estudios está bien establecido que la T3 actúa sinérgicamente con la vía β -adrenérgica para estimular la expresión de genes que contienen sitios CRE y TRE (Silva y Bianco, 2008; Dorsa et al., 2010), pero también hay evidencia de que la T3 reprime la expresión de genes que sólo contienen sitios CRE (Fukuyama et al., 2006; Méndez-Pertuz et al., 2003; Chen et al., 2011). La falta de sitios TRE en genes asociados con fenotipo neuroendócrino e invasión celular permite explicar el nulo efecto de la T3 en la expresión basal de estos genes, sugiriendo una respuesta indirecta de esta hormona en la respuesta al ISO.

Hay estudios que demuestran una interacción proteína-proteína entre los receptores de hormonas tiroideas y CREB en presencia de T3 (complejo TR-T3-CREB), reduciendo la habilidad de PKA para fosforilar a CREB (Fukuyama et al., 2006; Méndez-Pertuz et al., 2003). En este estudio, la T3 no previno totalmente la fosforilación de CREB, sugiriendo que el efecto antagónico de T3 en la vía β -adrenérgica no ocurre primordialmente a este nivel. Por ejemplo, en miocitos, la T3 inhibe la expresión del gen del canal de calcio tipo L inhibiendo la translocación nuclear de pCREB (Chen et al., 2011). Otra posibilidad es que la T3 podría inhibir otros efectores río abajo de la vía β -adrenérgica asociada con progresión tumoral, como EPAC, factor de transcripción de globina (GATA-1) o proteína activadora 1 (AP-1) (Cole y Sood, 2012).

Estudios en curso de nuestro grupo están analizando el efecto antagónico de la T3 en la vía β -adrenérgica. Por otro lado, la T3 sola ni combinada con ISO tuvo efecto en la respuesta tumorogénica de las células DU145. Como se mencionó antes, esta

falta de respuesta podría estar relacionada con el estado de dediferenciación y/o capacidad invasiva de estas células. El receptor nuclear tiroideo TR- β 1 ha sido identificado tanto en las células LNCaP como en las DU145 (Zhang et al., 1999); pero sólo en las células LNCaP la T3 tiene efectos proliferadores (Hsieh y Juang 2005; Esquenet et al., 1995). En resumen, nuestros datos *in vivo* e *in vitro* indican que la T3 detiene la progresión del cáncer mediada por los receptores β -adrenérgicos en un modelo de cáncer diferenciado. La T4 exacerbó los efectos tumorigénicos del ISO (secreción de VEGF) en las células LNCaP, pero no tuvo efecto en las células DU145. Una posible comunicación cruzada entre la señalización β -adrenérgica y la activación de MAPK inducida por T4 podría explicar esta sobre-respuesta en las células LNCaP; sin embargo, esta relación parece ser compleja y poco clara. Estudios clínicos y experimentales han mostrado que la hipertensión sistólica y/o diastólica crónica está asociada con un alto riesgo de mortalidad por cáncer prostático, así como la disminución de T4 y T3 libres (Iida et al., 2012; Weltman et al., 2015). Mientras que los efectos antagónicos de la T3 en la vía β -adrenérgica son consistentes con la noción de que este sinergismo se pierde cuando uno de estos sistemas está sobre estimulado o disminuido, estudios más meticulosos son necesarios para entender si los cambios en la relación T4/T3 libres podría ser relevante en la progresión del cáncer de próstata. Aunque datos epidemiológicos sugieren que altos niveles de T4 incrementan el riesgo de cáncer de próstata (Mondul et al., 2012), este estudio muestra que una dosis moderada y continua de T3 podría prevenir o retrasar la progresión tumoral en una condición de hiperactividad adrenérgica. Estudios clínicos y de investigación básica apoyan la propuesta de que el estrés emocional (depresión, conductual y quirúrgico aceleran la progresión del cáncer de próstata (Wade et al., 2013; Hassan et al., 2013). Este hecho debería ser considerado por los oncólogos, dado que el fracaso de algunas terapias podría estar relacionado con los altos niveles de ansiedad de los pacientes con cáncer. Sería interesante analizar si esta dosis de T3 administrada a pacientes con cáncer prostático pudiera contrarrestar el input simpático central incrementado asociado con el hipotiroidismo o la respuesta al estrés, y si esta dosis podría mejorar la eficacia de tratamientos antineoplásicos. Un estudio reciente mostró que la T3 potencia la efectividad de la quimioterapia en pacientes con cáncer mamario (Huang et al., 2013).

En resumen, el presente estudio mostró hallazgos consistentes y complementarios tanto en los tumores inducidos con células LNCaP como en cultivo. Se mostró que las hormonas tiroideas ejercen importantes efectos moduladores, estimulando o inhibiendo la progresión del cáncer prostático. Los efectos protectores de T3 en la adquisición del fenotipo NE e invasión celular inducida por la estimulación β -adrenérgica están asociados a un mecanismo independiente de pCREB. Se requieren hacer más estudios para evaluar los mecanismos moleculares de la relación T4/T3 libres en estos procesos. En la Figura 19 se muestra el mecanismo que se propone para la posible interacción de las hormonas tiroideas con la vía β -adrenérgica.

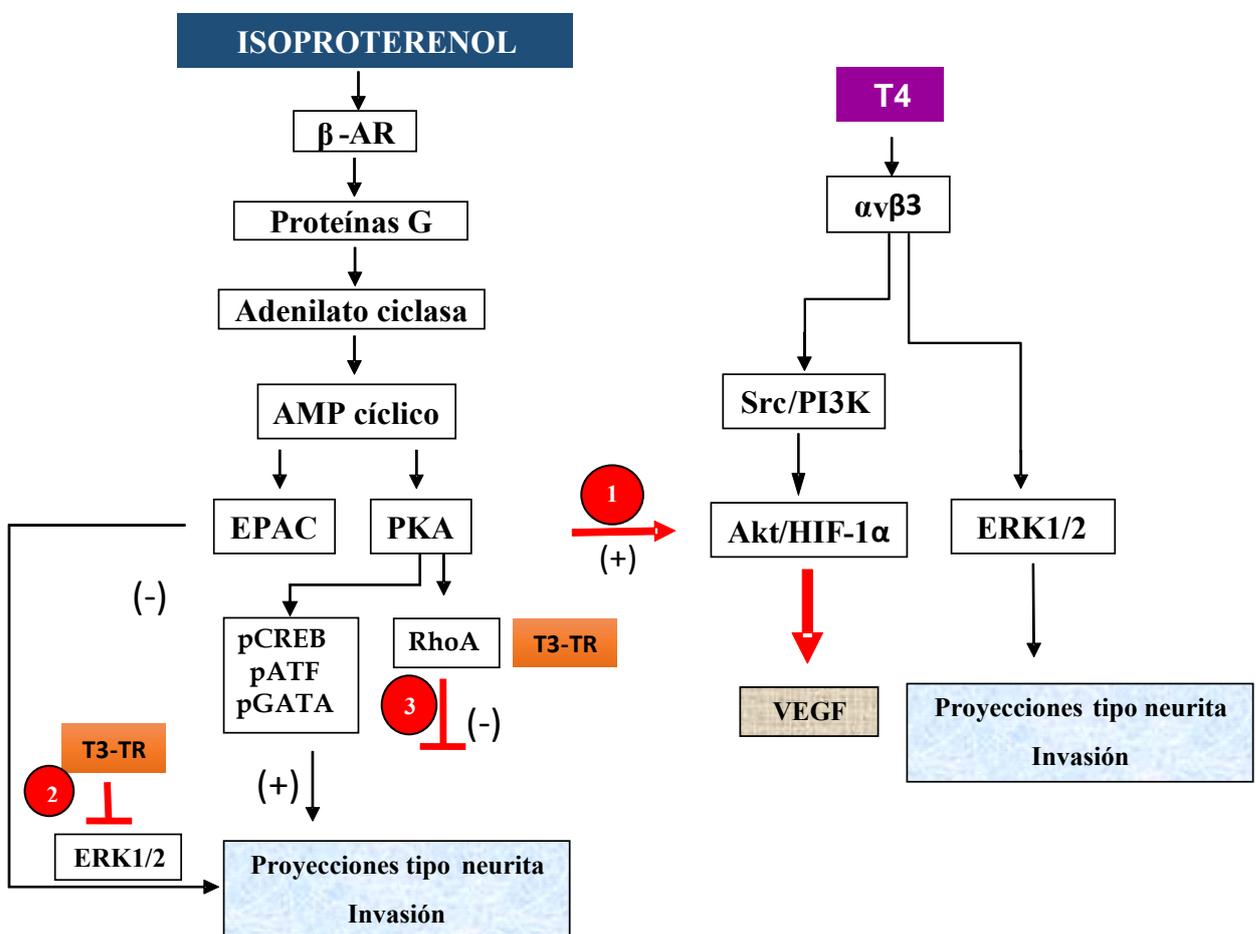


Figura 19. Propuesta del mecanismo a través del cual la estimulación β -adrenérgica y la T4 podrían favorecer la progresión del cáncer prostático, y cómo la T3 podría antagonizar esta respuesta adrenérgica. En algunos tipos de cáncer se ha mostrado que el ISO y la T4 favorecen la adquisición de un fenotipo neuroendócrino (proyecciones tipo neurita) y la invasión celular, a través de activar la vía β -adrenérgica (cAMP/PKA/pCREB) o la vía T4-integrina $\alpha v \beta 3$ (Akt/HIF-1 α , MAPK). En este estudio (1), el efecto sinérgico entre ISO y T4 sobre la secreción de VEGF observado podría ser explicado a través de activar un efector común Akt/HIF-1 α (vía PKA o Src/PI3K). Aunque en este estudio no se observó, en otros modelos se ha reportado que el complejo T3-receptor (TR) puede interactuar con CREB e inhibir su fosforilación vía PKA o MAPK. En este estudio, se mostró que la T3 previene la progresión mediada por la estimulación β -adrenérgica por mecanismos independientes de pCREB. Es

probable que la T3 antagonice la fosforilación de otros efectores río abajo de la vía β -adrenérgica como MAPK (2) o RhoA (3) favoreciendo la inhibición del fenotipo neuroendócrino.

CONCLUSIONES

1.- La activación de los receptores β -adrenérgicos y el tratamiento con T4 favoreció la progresión tumoral, a través de promover la adquisición de un fenotipo neuroendócrino y la invasión celular.

2.- La T3 redujo el crecimiento tumoral y previno la progresión tumoral inducida por la estimulación β -adrenérgica por un mecanismo independiente de CREB.

Los hallazgos sugieren que la relación T4/T3 en el tumor, podría ser relevante en la progresión del proceso carcinogénico.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se mostró que las hormonas tiroideas regulan de manera diferencial la respuesta tumorigénica. La T4 y la estimulación β -adrenérgica incrementan la progresión tumoral, mientras que la T3 la atenúa. Estos resultados ponen en evidencia la importancia que la relación T4/T3 puede tener en el desarrollo del cáncer prostático, y permiten plantear a futuro las siguientes propuestas:

1.- Los datos sugieren que en una condición de hipertiroxinemia (sistémica y/o local) se podría favorecer la tumorigénesis, por lo que una propuesta a futuro sería analizar si en estas condiciones, una dosis moderada de T3 podría inhibir la secreción de T4 (retroalimentación negativa del eje tiroideo) y mantener sus efectos anti-tumorigénicos.

2.- Por otro lado, también se podría explorar el efecto coadyuvante de la T3 con algunos fármacos de elección contra el cáncer prostático (anti-andrógenos, quimioterapéuticos, anti-adrenérgicos), pues se ha visto que en cáncer mamario, el tratamiento con T3 a dosis fisiológicas, sensibiliza a las células tumorales al tratamiento con quimioterapéuticos (Huang et al., 2013).

3.- Finalmente, se podría evaluar la co-administración de T3 con antagonistas β -adrenérgicos. El uso de antagonistas β -adrenérgicos está asociado a una mayor sobrevivencia de pacientes con cáncer prostático (Grytli et al., 2013). Sin embargo, se tendría que evaluar el impacto que una dosis moderada de T3 tendría en la fisiología cardiovascular.

BIBLIOGRAFÍA

Abate-Shen C, Shen MM. 2002. Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet.* 18, S1-S5.

Abrahamsson PA. 1999. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer.* 6, 503-519.

Adli H, Bazin R, Vassy R, Perret GY. 1997. Effects of triiodothyronine administration on the adenylyl cyclase system in brown adipose tissue of rat. *Am J Physiol.* 273, E247-E253.

American Cancer Society. 2015. *Cancer facts and figures.* Atlanta. American Cancer Society.

Andrade-Rocha FT. 2007. Assessment of exfoliated prostate cells in semen. *Am J Clin Pathol.* 128, 788-793.

Anguiano B, López A, Delgado G, Romero C, Aceves C. 2006. Deiodinase type 1 activity is expressed in the prostate of pubescent rats and is modulated by thyroid hormones, prolactin and sex hormones. *J Endocrinol.* 190, 363-371.

Angulo-Barbosa S. 2014. *Actividad sexual y biodisponibilidad de tironinas en el cáncer prostático.* Tesis de maestría. Instituto de Neurobiología-UNAM.

Armaiz-Pena, GN, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. 2009. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behav Immun.* 23, 10-15.

Aruldhas MM, Ramalingam N, Jaganathan A, John Sashi AM, Stanley JA, Nagappan AS, Vasavan J, Kannan A, Seshadri VN. 2010. Gestational and neonatal-onset hypothyroidism alters androgen receptor status in rat prostate glands at adulthood. *Prostate.* 70, 689-700.

Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R, Ding Y, Wheeler TM, Shine D, Kadmon D, Thompson T, Miles BJ, Ittmann MM, Rowley D. 2008. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 14, 7593-7603.

Bahouth SW. 1995. Thyroid hormone regulation of transmembrane signalling in neonatal rat ventricular myocytes by selective alteration of the expression and coupling of G-protein alpha-subunits. *Biochem J.* 307, 831-841.

Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, Ha MJ, Tsokos M, Sheahan MD, Nguyen P, Niklinski WT, Myers CE, Trepel JB. 1994. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 5330-5334.

Barbieri A, Bimonte S, Palma G, Luciano A, Rea D, Giudice A, Scognamiglio G, La Mantia E, Franco R, Perdonà S, De Cobelli O, Ferro M, Zappavigna S, Stiuso P, Caraglia M, Arra C. 2015. The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 47, 527-534.

Bartoletti R, Gavazzi A, Cai T, Mondaini N, Morelli A, Del Popolo G, Geppetti P. 2009. Prostate growth and prevalence of prostate diseases in early onset spinal cord injuries. *Eur Urol.* 56, 142-148.

Bavadekar S, Budajaja F, Patel K, Vansal S. 2013. Epinephrine stimulates secretion of VEGF by human prostate cancer cells, LNCaP, through a beta2-adrenergic receptor-mediated pathway. *FASEB J.* 27, 1105.11.

Berruti A, Vignani F, Russo L, Bertaglia V, Tullio M, Tucci M, Poggio M, Dogliotti L. 2010. Prognostic role of neuroendocrine differentiation in prostate cancer, putting together the pieces of the puzzle. *Open Access J Urol.* 23, 109-124.

Berthonneche C, Peter B, Schüpfer F, Hayoz P, Kutalik Z, Abriel H, Pedrazzini T, Beckmann JS, Bergmann S, Maurer F. 2009. Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains. *PLoS One.* 4, e6610.

Bonkhoff H, Stein U y Remberger K. 1995. Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Hum Pathol.* 26, 167-170.

Bostwick DG, Brawer MK. 1987. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer.* 59, 788-794.

Braadland PR, Ramberg H, Grytli HH, Taskén KA. 2015. β -Adrenergic Receptor Signaling in Prostate Cancer. *Front Oncol.* 12, 375.

Bruschini H, Schmidt RA, Tanagho EA. 1978. Neurologic control of prostatic secretion in the dog. *Invest Urol.* 15, 288-290.

Canaff L, Bevan S, Wheeler DG, Mouland AJ, Rehfuss RP, White JH, Hendy GN. 1998. Analysis of molecular mechanisms controlling neuroendocrine cell specific transcription of the chromogranin A gene. *Endocrinology.* 139,1184-1196.

Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. 2012. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol.* 61, 1079-1092.

Chen WJ, Yeh YH, Lin KH, Chang GJ, Kuo CT. 2011. Molecular characterization of thyroid hormone-inhibited atrial L-type calcium channel expression: implication for atrial fibrillation in hyperthyroidism. *Basic Res Cardiol.* 106, 163-174.

Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 31, 139-170.

Chow PH, O WS. 1989. Effects of male accessory sex glands on sperm transport, fertilization and embryonic loss in golden hamsters. *Int J Androl.* 12, 155-163.

Ciavardelli D, Bellomo M, Crescimanno C, Vella V. 2014. Type 3 deiodinase: role in cancer growth, stemness, and metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5, 215.

Cindolo L, Cantile M, Vacherot F, Terry S, de la Taille A. 2007. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: from lab to bedside. *Urol Int.* 79, 287-296.

Cole SW, Sood AK. 2012. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res.* 18, 1201-1206.

Conteduca V, Aieta M, Amadori D, De Giorgi U. 2014. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: current and emerging therapy strategies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 92, 11-24.

Cox ME, Deeble PD, Bissonette EA y Parsons SJ. 2000. Activated 3'5'-cyclic AMP dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *J Biol Chem.* 275, 13812-13818.

Cox ME, Deeble PD, Lakhani S, Parsons SJ. 1999. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: Implications for Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* 59, 3821-3830.

Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ y Sugimura Y. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev.* 8, 338-361.

Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92, 221-236.

Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 29, 211-218.

Deeble PD, Murphy DJ, Parsons SJ, Cox ME. 2001. Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Mol Cell Biol.* 21, 8471-8482.

Delgado-González E, Aceves C, Anguiano B. 2011. Postejaculatory increase of prostatic triiodothyronine (T3) depends on sympathetic innervation in the rat. *Biol Reprod.* 84, 118-123.

di Blasio L, Droetto S, Norman J, Bussolino F, Primo L. 2010. Protein kinase D1 regulates VEGF-A-induced α v β 3 integrin trafficking and endothelial cell migration. *Traffic.* 11, 1107-1118.

Dorsa KK, Santos MV, Silva MR. 2010. Enhancing T3 and cAMP responsive gene participation in the thermogenic regulation of fuel oxidation pathways. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 54, 381-389.

Emery AC, Eiden MV, Eiden LE. 2014. Separate cyclic AMP sensors for neurogenesis, growth arrest, and survival of neuroendocrine cells. *J Biol Chem.* 289, 10126-10139.

Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G. 1995 Triiodothyronine modulates growth, secretory function and androgen receptor concentration in the prostatic carcinomacell line LNCaP. *Mol Cell Endocrinol.* 109, 105-111.

Farwell AP, Dubord-Tomasetti SA, Pietrzykowski AZ, Stachelek SJ, Leonard JL. 2005. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. *Brain Res Dev Brain Res.* 154, 121-135.

Frau C, Loi R, Petrelli A, Perra A, Menegon S, Kowalik MA, Pinna S, Leoni VP, Fornari F, Gramantieri L, Ledda-Columbano GM, Giordano S, Columbano A. 2015. Local hypothyroidism favors the progression of preneoplastic lesions to hepatocellular carcinoma in rats. *Hepatology.* 61, 249-259.

Fukuda M, Gotoh Y, Tachibana T, Dell K, Hattori S, Yoneda Y, Nishida E. 1995. Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. *Oncogene.* 11, 239-244.

Fukuyama K, Ichiki T, Imayama I, Ohtsubo H, Ono H, Hashiguchi Y, Takeshita A, Sunagawa K. 2006. Thyroid hormone inhibits vascular remodeling through suppression

of cAMP response element binding protein activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 2049-2055.

Ganesh B, Saoba SL, Sarade MN, Pinjari SV. 2011. Risk factors for prostate cancer: An hospital-based case-control study from Mumbai, India. *Indian J Urol.* 27, 345-350.

Gann PH, Daviglus ML, Dyer AR, Stamler J. 1995. Heart rate and prostate cancer mortality: results of a prospective analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 4, 611-616.

Gereben B, Zeöld A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC. 2008. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci.* 65, 570-590.

Giralt M, Park EA, Gurney AL, Liu JS, Hakimi P, Hanson RW. 1991. Identification of a thyroid hormone response element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene. Evidence for synergistic interaction between thyroid hormone and cAMP cis-regulatory elements. *J Biol Chem.* 266, 21991-21996.

Gittes RF. 1991. Carcinoma of the prostate. *N Engl J Med.* 324, 236-245.

Goepel M, Wittmann A, Rübber H, Michel MC. 1997. Comparison of adrenoceptor subtype expression in porcine and human bladder and prostate. *Urol Res.* 25, 199-206.

Groos S, Wilhelm B, Renneberg H, Riva A, Reichelt R, Seitz J y Amüller G. 1999. Simultaneous apocrine and merocrine secretion in the rat coagulating rat. *Cell Tissue Res.* 295, 495-504.

Guo K, Ma Q, Wang L, Hu H, Li J, Zhang D, Zhang M. 2009. Norepinephrine induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. *Oncol Rep.* 22, 825-830.

Grytli HH, Fagerland MW, Fosså SD, Taskén KA, Håheim LL. 2013. Use of β -blockers is associated with prostate cancer-specific survival in prostate cancer patients on androgen deprivation therapy. *Prostate.* 73, 250-260.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57-70.

Hanson RW, Reshef L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvatecarboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem*. 66, 581-611.

Harris AM, Warner BW, Wilson JM, Becker A, Rowland RG, Conner W, Lane M, Kimbler K, Durbin EB, Baronand AT, Kyprianou N. 2007. Effect of α -1adrenoreceptor antagonist exposure on prostate cancer incidence: an observational cohort study. *J Urol*. 178, 2176-2180.

Hassan MM, Kaseb A, Li D, Patt YZ, Vauthey JN, Thomas MB, Curley SA, Spitz MR, Sherman SI, Abdalla EK, Davila M, Lozano RD, Hassan DM, Chan W, Brown TD, Abbruzzese JL. 2009. Association between hypothyroidism and hepatocellular carcinoma: a case control study in the United States. *Hepatology*. 49, 1563-1570.

Hassan S, Karpova Y, Baiz D, Yancey D, Pullikuth A, Flores A, Register T, Cline JM, D'Agostino R Jr, Danial N, Datta SR, Kulik G. 2013. Behavioral stress accelerates prostate cancer development in mice. *J Clin Invest*. 123, 874-886.

Henderson KK, Danzi S, Paul JT, Leya G, Klein I, Samarel AM. 2009. Physiological replacement of T3 improves left ventricular function in an animal model of myocardial infarction-induced congestive heart failure. *Circ Heart Fail*. 2, 243-252.

Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 43, 1809-1818.

Hsieh ML, Juang, HH. 2005. Cell growth effects of triiodothyronine and expression of thyroid hormone receptor in prostate carcinoma cells. *J Androl*. 26, 422-428.

Huang J, Jin L, Ji G, Xing L, Xu C, Xiong X, Li H, Wu K, Ren G, Kong L. 2013. Implication from thyroid function decreasing during chemotherapy in breast cancer patients: chemosensitization role of triiodothyronine. *BMC Cancer*. 13, 334.

Humez S, Monet M, Legrand G, Lepage G, Delcourt P, Prevarskaya N. 2006. Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 13, 181-195.

Iida M, Yamamoto M, Ishiguro Y, Yamazaki M, Honjo H, Kamiya K. 2012. Thyroid hormone within the normal range is associated with left ventricular mass in patients with hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 6, 261-269.

Jacobs SC, Story MT. 1989. Autonomic control of acid phosphatase exocrine secretion by the rat prostate. *Urol Res*. 1989 17, 311-315.

Jänig W. 2006. The integrative action of the autonomic nervous system. *Neurobiology of homeostasis*. UK: Cambridge Press.

Jiang L, Kunos G. 1995. Sequence of the 5' regulatory domain of the gene encoding the rat beta 2-adrenergic receptor. *Gene*. 163, 331-332.

Jones SE, Palmer TM. 2012. Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell Signal*. 24, 1504-1514.

Keast, JR. 1999. The autonomic nerve supply of male sex organs. An important target of circulating androgens. *Behav Brain Res*. 105, 81-92.

Kim WG, Zhao L, Kim DW, Willingham MC, Cheng S. 2014. Inhibition of tumorigenesis by the thyroid hormone receptor β in xenograft models. *Thyroid*. 24, 260-269.

Knobil E, Neill J. 1994. *The Physiology of Reproduction*. USA: Raven Press. pp 1083-1085.

Komiya A, Susuki H, Imamoto T, Kamiya N, Nihei N, Naya Y, Ichikawa T, Fuse H. 2009. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int J Urol.* 16, 37-44.

Kwon TK, Nagel JE, Buchholz MA, Nordin AA. 1996. Characterization of the murine cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27Kip1. *Gene.* 180,113-120.

Lang S, Drell IV TL, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, Entschladen F. 2004. Induction of a metastogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer.* 112, 231-238.

Lehrer, S. Diamond EJ, Stone N, Droller M, Stock R. 2002. Serum triiodothyronine is increased in men with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology.* 168, 2431-2433.

Ligr M, Li Y, Zou X, Daniels G, Melamed J, Peng Y, Wang W, Wang J, Ostrer H, Pagano M, Wang Z, Garabedian MJ, Lee P. 2010. Tumor suppressor function of androgen receptor coactivator ARA70alpha in prostate cancer. *Am J Pathol.* 176, 1891-1900.

Lin HY, Davis FB, Gordinier JK, Martino LJ, Davis PJ. 1999. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am J Physiol.* 276, C1014-C1024.

Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. 2009 L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296:C980-C981.

López-Juárez A, Delgado G, Aceves C, Anguiano B. 2009. Type 1 deiodinase activity and generation of triiodothyronine (T3) in prostate of sexually active rats. *Prostate.* 69, 1651-1659.

Lutgendorf S, Cole S, Constanzo E, Bradley S, Coffin J, Jabbari S, Rainwater K, Ritchie JM, Yang M, Sood AK. 2003. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 9, 4514-4521.

Maggi CA. *Nervous Control of the Urogenital System.* 1993. En: *The Autonomic Nervous System.* Harwood UK: Academic Publishers.

Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, Frenette PS. 2013. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science.* 341, 1236361.

Maran, R.R., Senthilkumaran, B., Udhayakumar, R.C., Arunakaran, J, Aruldhas, M.M. 2000. Thyroidectomy modulates rat prostatic monosaccharides. *Int J Androl.* 23, 156-162.

Maran, RR, Aruldhas, MM. 2002. Adverse effects of neonatal hypothyroidism on Wistar rat spermatogenesis. *Endocrine Research,* 28, 141-154.

Marchiani S, Tamburrino L, Nesi G, Paglierani M, Gelmini S, Orlando C, Maggi M, Forti G, Baldi E. 2010. Androgen-responsive and -unresponsive prostate cancer cell lines respond differently to stimuli inducing neuroendocrine differentiation. *Int J Androl.* 33, 784-793.

Marker P, Donjacour A, Dahiya R y Cunha GR. 2003. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 253, 165-174.

Martínez-Iglesias O, García-Silva S, Regadera J, Aranda A. 2009. Hypothyroidism enhances tumor invasiveness and metastasis development. *Plos One.* 4, e6428.

McKeithen D, Graham T, Chung LW, Odero-Marah V. 2010. Snail transcription factor regulates neuroendocrine differentiation in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate.* 70, 982-992.

McVary K, Razzaq A, Lee C, Venegas M, Rademaker A, McKenna K. 1994. Growth of the rat prostate gland is facilitated by the autonomic nervous system. *Biol Reprod.* 51, 99-107.

McVary KT, McKenna KE, Lee C. 1998. Prostate innervation. *Prostate Suppl.* 8, 2-13.

McWilliam LJ, Manson C, George NJ. 1997. Neuroendocrine differentiation and prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Br J Urol.* 80, 287–290.

Méndez-Pertuz M, Sánchez-Pacheco A, Aranda A. 2003. The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO Journal* 22, 3102-3112.

Moeller LC, Führer D. 2013. Thyroid hormone, thyroid hormone receptors, and cancer: a clinical perspective. *Endocr Relat Cancer.* 20, R19-R29.

Mondal S, Raja K, Schweizer U, Mugesh G. 2016. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. *Angew Chem Int Ed Engl.* 55, 7606-7630.

Mondul AM, Weinstein SJ, Bosworth T, Remaley AT, Virtamo J, Albanes D. 2012. Circulating thyroxine, thyroid-stimulating hormone, and hypothyroid status and the risk of prostate cancer. *PLoS One* 7, e47730.

Mori S, Murakami-Mori K, Bonavida B. 1999. Interleukin-6 induces G1 arrest through induction of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, and neuron-like morphology in LNCaP prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 257, 609-614.

Moriggi G, Verga Falzacappa C, Mangialardo C, Michienzi S, Stigliano A, Brunetti E, Toscano V, Misiti S. 2011. Thyroid hormones (T3 and T4): dual effect on human cancer cell proliferation. *Anticancer Res.* 31, 89-96.

Mousa SA, O'Connor L, Davis FB, Davis PJ. 2006. Proangiogenesis action of the thyroid hormone analog 3,5-diiodothyropropionic acid (DITPA) is initiated at the cell surface and is integrin mediated. *Endocrinology.* 147, 1602-1607.

Mullur R, Liu YY, Brent GA. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 94, 355-382.

Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ. 2001. Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology* 142, 4795-4805.

National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of laboratory animal resources commission on life sciences. National academy press. Washington.

Palm D, Lang K, Niggemann B, Drell TL, Masur K, Zaenker KS, Entschladen F. 2005. The norepinephrine driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by β -blockers. *Int J Cancer.* 118, 2744-2749.

Pantelouris EM. 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature.* 217, 370-371.

Parikesit D, Mochtar CA, Umbas R, Hamid AR. 2016. The impact of obesity towards prostate diseases. *Prostate Intl.* 4, 1-6.

Park SY, Kang JH, Jeong KJ, Lee J, Han JW, Choi WS, Kim YK, Kang J, Park CG, Lee HY. 2011. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1 α protein-dependent mechanism. *Int J Cancer.* 128, 2306-2316.

Pérez-Juste G, Aranda A. 1999. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J Biol Chem.* 274, 5026-5031.

Perra A, Kowalik MA, Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Columbano A. 2009. Thyroid hormone receptor ligands induce regression of rat preneoplastic liver lesions causing their reversion to a differentiated phenotype. *Hepatology.* 49, 1287-1296.

Perron L, Bairati I, Harel F y Meyer F. 2004. Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada). *Cancer Causes Control*. 15, 535-541.

Perrot V. 2012. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer: an update on recent developments. *Open Journal of Urology* 2, 173-182.

Pinski J, Wang Q, Quek ML, Cole A, Cooc J, Danenberg K, Danenberg PV. 2006. Genistein-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Prostate*. 66, 1136-1143.

Pinto M, Soares P, Ribatti D. 2011. Thyroid hormone as a regulator of tumor induced angiogenesis. *Cancer Lett*. 301, 119-126.

Platz EA, Kawachi I, Rimm EB, Graham CD, Stampfer MJ, Willet WC, Giovannucci E. 1998. Physical activity and benign prostatic hyperplasia. *Arc Int Med*. 158, 2349-2356.

Plecas B, Pesić V, Lalić N, Solarović T, Hristić M. 2000. Beta-adrenergic receptor manipulation and acid phosphatase and zinc levels in the ventral prostate of the adult rat. *Pharmazie*. 55, 136-139.

Rabelo R, Schifman A, Rubio A, Sheng X, Silva JE. 1995. Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene. *Endocrinology*. 136, 1003-1013.

Ramberg H, Eide T, Krobert KA, Levy FO, Dizeyi N, Bjartell AS, Abrahamsson PA y Taskén KA. 2008. Hormonal regulation of beta-2 adrenergic receptor level in prostate cancer. *Prostate*. 68, 1133-1142.

Rao J, Yang J, Liu Z, Wang L, Yin Z, Liu L, He Q, Yang L. 2008. Hypothetic association between greater sympathetic activity and prostate cancer. *Med Hypotheses*. 71, 442-443.

Rapiejko PJ, Watkins DC, Ros M, Malbon CC. 1989. Thyroid hormones regulate G-protein beta-subunit mRNA expression in vivo. *J Biol Chem*. 264, 16183-16189.

Rodríguez RR, Carballido Rodríguez J. 2007. Hiperplasia benigna de la próstata. *Medicine*. 9, 5328-5341.

Sánchez-Pacheco A, Palomino T, Aranda A. 1995. Negative regulation of expression of the pituitary-specific transcription factor GHF-1/Pit-1 by thyroid hormones through interference with promoter enhancer elements. *Mol Cell Biol*. 15, 6322-6330.

Santamaría L, Ingelmo I, Alonso L, Pozuelo JM, Rodríguez R. 2007. Neuroendocrine Cells and Peptidergic Innervation in Human and Rat Prostate. *Advances in Anatomy, Embriology and Cell Biology* 194. España: Springer. pp 4

Santoni M, Conti A, Burattini L, Berardi R, Scarpelli M, Cheng L, Lopez-Beltran A, Cascinu S, Montironi R. 2014. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: novel morphological insights and future therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta*. 1846, 630-637.

Sar P, Peter R, Rath B, Das Mohapatra A, Mishra SK. 2011. 3, 3'5 Triiodo L thyronine induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells, repressing SMP30 expression through negative thyroid response elements. *PLoS One*. 6, e20861.

Sastry KR, Karpova Y, Prokopovich S, Smith AJ, Essau B, Gersappe A, Carson JP, Weber MJ, Register TC, Chen YQ, Penn RB, Kulik G. 2007. Epinephrine Protects Cancer Cells from Apoptosis via Activation of cAMP-dependent Protein Kinase and BAD Phosphorylation. *J Biol Chem*. 282, 14094-14100.

Segal J, Buckley C, Ingbar SH. 1985. Stimulation of adenylate cyclase activity in rat thymocytes in vitro by 3,5,3'-triiodothyronine. *Endocrinology*. 116, 2036-2043.

Shinderman-Maman E, Cohen K, Weingarten C, Nabriski D, Twito O, Baraf L, Hercbergs A, Davis PJ, Werner H, Ellis M, Ashur-Fabian O. 2016. The thyroid hormone- $\alpha\beta 3$ integrin axis in ovarian cancer: regulation of gene transcription and MAPK-dependent proliferation. *Oncogene*. 35, 1977-1987.

Sidharthan V, Rajalingam R, Aruldas MM, Govindarajulu P. 1993. Ventral prostatic phosphomonoesterases and adenosine triphosphatases in hypo- and hyperthyroid albino rats. *Indian J Exp Biol.* 31, 414-416.

Silva J. 2000. Catecholamines and the sympathoadrenal system in hypothyroidism. En: Werner & Ingbar's *The thyroid a fundamental and clinical text*. Braverman LE, Utiger RD (eds). Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, pp 820-821.

Silva J, Silva C y Saraiva L. 2008. Intraprostatic botulinum toxin type A injection in patients unfit for surgery presenting with refractory urinary retention and benign prostatic enlargement. Effect on prostate volume and micturition resumption. *Eur Urol.* 53, 153-159.

Silva J, Pinto R, Carvallho T, Coelho A, Avelino A, Dinis P, Cruz F. 2009. Mechanisms of prostate atrophy after glandular botulinum neurotoxin A type A injection: An experimental study in the rat. *Eur Urol*, 56, 134-141.

Silva JE, Bianco SD. 2008. Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. *Thyroid.* 18, 157-165.

Silva JE, Rabelo R. 1997. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol.* 136, 251-264.

Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer.* 21,274-281.

Suzuki S, Miyamoto T, Opsahl A, Sakurai A, DeGroot LJ. 1994. Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1. *Mol Endocrinol.* 8, 305-314.

Tai PJ, Huang YH, Shih CH, Chen RN, Chen CD, Chen WJ, Wang CS, Lin KH. 2007. Direct regulation of androgen receptor associated protein 70 by thyroid hormone and its receptors. *Endocrinology.* 148, 3485-3495.

Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, Jennings NB, Armaiz Pena G, Bankson J, Ravoori M, Merritt WM, Lin YG, Mangala LS, Kim TJ, Coleman RL, Landen CN, Li Y, Felix E, Sanguino AM, Newman RA, Lloyd M, Gershenson DM, Kundra V, Lopez Berestein G, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. 2006. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Med.* 12, 939-944.

Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK. 2007. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell cycle.* 6, 430-433.

Theodossiou C, Skrepnik N, Robert EG, Prasad C, Axelrad TW, Schapira DV, Hunt JD. 1999. Propylthiouracil-induced hypothyroidism reduces xenograft tumor growth in athymic nude mice. *Cancer.* 1596-1601.

Thompson HJ. 2000. Methods for the induction of mammary carcinogenesis in the rat using either 7,12-dimethylbenz(α)anthracene or 1-methyl-1-nitrosourea. En: *Methods in mammary gland biology and breast cancer research.* Ip MM, Asch BB (eds.) Klumer Academic/Plenum Publishers New York, p 19.

Tsui KH, Hsieh WC, Lin MH, Chang PL, Juang HH. 2008. Triiodothyronine modulates cell proliferation of human prostatic carcinoma cells by downregulation of the B-cell translocation gene 2. *Prostate.* 68, 610-619.

Uehara H, Nakaizumi A, Baba M, Iishi H, Tatsuta M. 1993. Enhancement by isoproterenol of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Int J Cancer.* 53, 703-706.

von der Ahe D, Pearson D, Nagamine Y. 1990. Macromolecular interaction on a AMP responsive region in the urokinase plasmin activator gene: a role of protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 18, 1991-1999.

Wade J, Rosario DJ, Macefield RC, Avery KN, Salter CE, Goodwin ML, Blazeby JM, Lane JA, Metcalfe C, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL. 2013. Psychological impact of

prostate biopsy: physical symptoms, anxiety, and depression. *J Clin Oncol.* 31, 4235-4241.

Wang, J., McKenna, K., McVary, K., Lee, C. 1991. Requirement of innervation for maintenance of structural and functional integrity in the rat prostate. *Biol Reprod.* 44, 1171-1176.

Weltman NY, Pol CJ, Zhang Y, Wang Y, Koder A, Raza S, Zucchi R, Saba A, Colligiani D, Gerdes AM. 2015. Long-term physiological T3 supplementation in hypertensive heart disease in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 309, H1059-H1065.

Witkowski CM, Rabinovitz I, Nagle RB, Affinito KS, Cress AE. 1993. Characterization of integrin subunits, cellular adhesion and tumorigenicity of four human prostate cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 119, 637-644.

Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstralh E, Young CY. 2001. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. *Prostate* 48, 7-15.

Yang EV, Sood AK, Chen M, Li Y, Eubank TD, Marsh CB, Jewell S, Flavahan NA, Morrison C, Yeh PE, Lemeshow S, Glaser R. 2006. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res.* 66, 10357-10364.

Yang EV, Donovan EL, Benson DM, Glaser R. 2008. VEGF is differentially regulated in multiple myeloma-derived cell lines by norepinephrine. *Brain Behav Immun.* 22, 318-323.

Yang EV, Kim SJ, Donovan EL, Chen M, Gross AC, Webster Marketon JI, Barsky SH, Glaser R. 2009. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun.* 23, 267-275.

Young JB, Landsberg L. 1997. Suppression of sympathetic nervous system during fasting. *Obes Res.* 5, 646-649.

Yu J, Cao Q, Mehra R, Laxman B, Yu J, Tomlins SA, Creighton CJ, Dhanasekaran SM, Shen R, Chen G, Morris DS, Marquez VE, Shah RB, Ghosh D, Varambally S, Chinnaiyan AM. 2007. Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. *Cancer Cell*. 12, 419-431.

Yuan TC, Veeramani S, Lin FF, Kondrikou D, Zelivianski S, Igawa T, Karan D, Batra SK, Lin MF. 2006. Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocr Relat Cancer*. 13, 151-167.

Zhang CY, Kim S, Harney JW, Larsen PR. 1998 Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology*. 39, 1156-1163.

Zhang S, Hsieh M, Zhu W, Klee G, Tindall DJ, Young C. 1999. Interactive effects of triiodothyronine and androgens on prostate cell growth and gene expression. *Endocrinology*. 140, 1665-1671.

Zhang XQ, Kondrikov D, Yuan TC, Lin FF, Hansen J, Lin MF. 2003. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha signaling is involved in androgen depletion-induced neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells. *Oncogene*. 22, 6704-6716.

Zhu Y, Liu C, Cui Y, Nadiminty N, Lou W, Gao AC. 2014. Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *Prostate*. 74, 1086-1094.

ANEXO

Triiodothyronine attenuates prostate cancer progression mediated by β -adrenergic stimulation.

Delgado-González E, Sánchez Tusie AA, Morales, M, Aceves C, Anguiano B. 2016 Mol Med 22, 1-11.

Triiodothyronine Attenuates Prostate Cancer Progression Mediated by β -Adrenergic Stimulation

Evangelina Delgado-González, Ana Alicia Sánchez-Tusie, Giapsy Morales, Carmen Aceves, and Brenda Anguiano

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

Prostate cancer cells are responsive to adrenergic and thyroid stimuli. It is well established that β -adrenergic activation (protein kinase A (PKA)/cAMP response element binding protein (CREB)) promotes cancer progression, but the role of thyroid hormones is poorly understood. We analyzed the effects of β -adrenergic stimulation (isoproterenol (ISO)) and/or thyroid hormone on neuroendocrine (NE) differentiation and cell invasion, using *in vivo* (LNCaP tumor) and *in vitro* models (LNCaP and DU145 human cells). Nude mice were inoculated with LNCaP cells and were treated for 6 wks with ISO (200 μ g/d), triiodothyronine (T3, 2.5 μ g/d) or both. ISO alone reduced tumor growth but increased tumor expression of cAMP response element (CRE)-dependent genes (real-time polymerase chain reaction, chromogranin A, neuron-specific enolase, survivin, vascular endothelial growth factor (VEGF), urokinase plasmin activator (uPA) and metalloproteinase-9 (MMP-9)) and some proteins related to NE differentiation and/or invasiveness (synaptophysin, VEGF, pCREB). T3 reduced tumor growth and prevented the overexpression of ISO-stimulated factors through a pCREB-independent mechanism. In low invasive LNCaP cells, 50 μ mol/L ISO or 100 nmol/L thyroxine (T4) induced the acquisition of NE-like morphology (phase-contrast microscopy), increased VEGF secretion (ELISA) and invasive capacity (Transwell assay), but no synergistic effects were observed after the coadministration of ISO + T4. In contrast, 10 nmol/L T3 alone had no effect, but it prevented the NE-like morphology and invasiveness stimulated by ISO. None of these treatments had any effect on highly invasive DU145 cells. In summary, this study showed that ISO and T4 increase cancer progression, and T3 attenuates ISO-stimulated progression. Further studies are required to determine if changes in the ratio of T4/T3 could be relevant for prostate cancer progression.

Online address: <http://www.molmed.org>

doi: 10.2119/molmed.2015.00047

INTRODUCTION

Prostate cancer is the second leading cause of cancer death in men (1). Studies over the last two decades support the notion that long-term, sympathetic activation promotes the risk of prostate cancer through multiple mechanisms. Hypertensive patients have a two-fold higher risk of developing prostate cancer than nonhypertensive patients; consistent with this observation, the risk and mortality rate decrease in patients treated

for 3–5 years with adrenergic antagonists (2–7). Studies in human prostate cancer cells show that β -adrenergic/protein kinase A (PKA) activation promotes prostate cancer progression: it reduces cell proliferation (by decreasing p42-mitogen activated protein kinase [MAPK] and β -arrestin2/proto-oncogene tyrosine-protein kinase [c-Src]), and it activates survival pathways (induces phosphorylation of Bcl-2-associated death promoter [Bad] and inhibits caspases)

and cell migration (activates MAPK) (8–10). In agreement with this, studies in BALB/c nude mice grafted with highly invasive PC-3 prostate cancer cells show that β -adrenergic stimulation increases the number of metastases to lymph nodes, whereas sympathectomy has the opposite effect (11,12). A reduction in the time of tumor onset has also been observed in mice deficient in β -adrenergic receptors (*Adr β 2^{-/-}* and *Adr β 3^{-/-}*) (12). In low invasive LNCaP cells, β -adrenergic stimulation induces the acquisition of a highly malignant neuroendocrine (NE) phenotype. NE prostate tumors exhibit neurite-like (NE-like) projections; they synthesize and secrete amines and peptides, are androgen-receptor negative and apoptosis resistant (8,9,13,14). In humans, β 2-adrenergic receptors (ADR- β 2) are highly expressed in androgen-refractory metastatic tumors and are strongly associated with

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.

Submitted March 5, 2015; Accepted for publication February 19, 2016; Published Online (www.molmed.org) February 26, 2016.

malignancy (15). A pilot study in prostate biopsies showed an association between high levels of circulating epinephrine (>1 nmol/L) and phosphorylation of a target of PKA, the cAMP response element binding protein (pCREB) (16). NE-like cells can be present in either primary tumors or metastases of patients with prostate cancer, and these are notorious for being highly aggressive and resistant to hormonal therapy and cytotoxic agents (17,18).

Thyroid hormone effects in cancer remain poorly understood. In some carcinomas, thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) exert protumoral effects, stimulating cell proliferation and angiogenesis by nuclear (thyroid hormone receptors TR α and TR β 1) and/or non-nuclear mechanisms (α v β 3 integrin receptor/activation of MAPK and phosphoinositide 3-kinase [PI3K] pathways) (19–22). In contrast, in other types of cancer, T3 induces cell arrest (decreased Ras/increased cyclin-dependent kinase inhibitor [p27^{kip}]) and apoptosis (decreased senescence marker protein [SMP30]), and it promotes cell differentiation (23–25). Studies in LNCaP cells show that T3 increases cell proliferation and secretion of proteins of the prostate epithelium (26–28), but their involvement in cancer has not yet been demonstrated. Catecholamines and thyroid hormones act synergistically to regulate metabolism, but how they interact in cancer has not been analyzed. In any case, prostate gland is responsive to adrenergic and thyroid stimuli; on the other hand, T3 decreases activity of pCREB (29). Thus, the aim of the present study was to analyze the effects of β -adrenergic stimulation (isoproterenol [ISO]) and thyroid hormone, alone and combined, on cancer progression using *in vivo* and *in vitro* approaches.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

T4, T3 and T3 antibody and ISO bitartrate salt were obtained from Sigma. ¹²⁵I-T₃ (1,200 μ Ci/ μ g) was obtained from Perkin Elmer Life Sciences.

The enzyme immunoassay (EIA) kit for detection of total T3 was purchased from International Immuno-Diagnostics. ISO pellets were obtained from Innovative Research of America. Matrigel and Biocoat Matrigel invasion chambers were from BD Biosciences. Antibodies against vascular endothelial growth factor (VEGF) (SPM 225), synaptophysin (SYP) (H-03), cAMP response element binding protein (CREB-1) (240), pCREB-1 (Ser 133), goat anti-rabbit IgG–horseradish peroxidase (HRP) and goat anti-mouse IgG-HRP were from Santa Cruz Biotechnology. Peroxidase block solution and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) were from Dako. Nitrocellulose membranes were from Bio-Rad, and the electrochemiluminescent (ECL) detection system was from GE Healthcare Life Sciences. The VEGF human sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was from Abcam. All other reagents used in this study were of the highest purity commercially available.

Prostate Cancer Cell Lines

Cancerous human prostate cells were obtained directly from ATCC. LNCaP cells (CRL-1740, low invasive potential) were derived from a metastasis to lymph node and grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). DU145 cells (HTB-81, high invasive potential) were derived from a metastasis to brain and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% FBS. Both media were supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, and cultures were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

BALB/c Nude Mice and LNCaP Tumor Induction

Male nude BALB/c mice (*Foxn1*tm) were obtained from The Jackson Laboratory and housed in acrylic cages with filtered, pathogen-free air under a controlled temperature (22 \pm 1°C) and a 12/12-h day–night cycle (lights off at 1800). The animals had free access to rat chow (Purina) and tap water. LNCaP cells (5 \times 10⁶) were subcutaneously

injected in 100 μ L Matrigel into the back of 8-wk-old male nude mice. Procedures for handling and euthanasia of mice were reviewed and approved by the Comité de Ética en Investigación from Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla (protocol #014), and complied with guidelines from the Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council, USA (30).

Experimental Design

Effect of treatments on tumor induction, gene expression and NE differentiation. Two days after xenograft injection, a subset of mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (15 mg and 3 mg/kg of body weight, respectively) and implanted in the back with a controlled-release pellet of ISO (200 μ g/d). Another group received T3 in the drinking water (2.5 μ g/d), and a third group was cotreated with ISO and T3. All treatments were maintained for 6 wks, and five to six animals per group were analyzed. The doses of ISO and the T3 used in this study were based on prior experience showing that they do not compromise the health of the animals (31,32). Body weight, tumor incidence and tumor size were registered every week. Length and width of tumors were measured with a caliper, and the volume was calculated using the ellipsoid formula (33). Mice were sacrificed by decapitation, and blood serum was separated and frozen at –20°C for measurement of circulating T3 levels (radioimmunoassay [RIA]). Prostate tumors were processed for immunohistochemistry and molecular biology (EIA or polymerase chain reaction [PCR]). Tumors were fixed in 10% neutral buffered formalin to analyze for the presence of proteins related to NE differentiation (SYP) and invasiveness (VEGF). Tumor T3 levels were quantified by EIA, and gene expression was analyzed by real-time PCR. Table 1 shows the oligonucleotides used to analyze genes of the

Table 1. Oligonucleotides used for real-time PCR.

	Gene	GenBank ID	Sense	Antisense	Size (base pairs)
Thyroid hormone availability and action	<i>β-Actin</i>	001101	ACAGAGTACTTGGCGCTCAGGA	CCATCATGAAGTGTGACGTTG	185
	<i>MCT-8</i>	006517	GCGCTACTTCACCTACGGGA	CAGACACCACACCAITGGC	125
	<i>D1</i>	000792.5	TGGGAGTTTATCGAAGGTAATAGG	TGGAACATAAAGTCTCAATAAGCCTCTT	165
	<i>D3</i>	001362.3	TGAGACTCCTGGGGAATGAC	CAGCAGCTCGCCTAGGACT	110
	<i>TR-β1</i>	001128177	ATGACTCCCAACAGTATGACAG	TCCAGTCGTGTTCTCGGTCT	65
	<i>ARA70</i>	01145260	TGCCATTGGTCTTCAGGCTCCT	CAGGCATCGCTGAAGAACTGC	124
	<i>AR</i>	001011645	GGAATTCCTGTGCATGAAA	CGAAGTTCATCAAAGAATT	84
NE differentiation and cell invasion	<i>ADR-β2</i>	000024.5	GGCAGCTCCAGAAGATTGAC	GTCTTGAGGGCTTTGTGCTT	139
	<i>VEGF</i>	001025368	GGCCTCCGAAACCATGAACITTCCTGCT	CCTCCTGCCCGGCTCACCCGC	165
	<i>uPA</i>	01145031.1	GTGGCCAAAAGACTCTGAGG	CAAGCGTGTGACGCGTGTAG	267
	<i>MMP-9</i>	04994.2	TGG TCC TGG TGC TCC TGG TG	GCTGCCTGTGCGGTGAGATTGG	111
	<i>p27^{Kip}</i>	004064.3	ATGTCAAACGTGCGAGTGTG	TCTGTAGTAGAACTCGGGCAA	262
	<i>Survivin</i>	01012270.1	GATTGAATCGCGGGACCC	GATTGAATCGCGGGACCC	64
	<i>CgA</i>	001275.3	TGAACAGCCCTATGAATAAA	GATGAACCTCAGAGGTTCTTGAG	260
	<i>NSE</i>	001975.2	TGTGGTGGAGCAAGAGAACTGGA	TGGTGGCATCCTTGCCGTATTG	345

T3 response, NE differentiation and cell invasion. Most of the T3 response genes contain thyroid response element (TRE) sites, whereas the NE and invasiveness genes contain cAMP response element (CRE) sites.

Effect of treatments on NE differentiation and cell invasion in LNCaP and DU145 cells. LNCaP or DU145 cells (2×10^4) were seeded on 12-well plates in RPMI phenol red-free medium or DMEM, respectively, and both media were supplemented with 5% charcoal-stripped FBS. LNCaP and DU145 cells were treated for 6 and 4 d, respectively, with ISO (50 $\mu\text{mol/L}$), T3 (10 nmol/L), T4 (100 nmol/L), ISO + T3 or ISO + T4. The selected doses and times were based on previous assays (8,28,34). In both cell types, the number and length of neurite-like projections were measured in four random fields of non-clustered cells. The NE-like morphology of the cells was analyzed by phase-contrast microscopy (Olympus IX 50) at 20 \times magnification. Image analysis was performed using Infinity Capture and Infinity Analyze software, version 6.0 (Lumenera Corporation). VEGF secretion and cell invasion were analyzed as indicators of cancer progression. VEGF was quantified in the culture media by ELISA. Cell invasion was analyzed by Transwell assay

by using chambers coated with Matrigel matrix. In brief, 2.5×10^4 LNCaP or DU145 cells were added to the upper chamber of the Transwell with their respective treatment. The lower chamber was filled with RPMI or DMEM + 10% FBS as chemoattractant. After 36 h of incubation, the upper surfaces of the Transwells were wiped, and the inserts were fixed with methanol and stained with 1% toluidine blue in 1% borax solution. The number of invading cells was counted by light microscopy (Leica DM 2500, Leica Application Suite, version 2.8.1) in four fields per Transwell assay, by using ImageJ 1.43u software (National Institutes of Health [NIH]). The effects of treatments on total CREB and pCREB in LNCaP cells were analyzed by immunoblotting. To extract total protein, cells were incubated for 6 d and then lysed in RIPA buffer and centrifuged at 12,000g for 10 min at 4°C.

Analytical Methods

RIA. Circulating levels of T3 were measured by homologous RIA as previously described (35). The assay contained serum or standards (0.1–4.0 ng T3/mL), hypothalamic serum, anti-T3 antibody (1:2,000) and ^{125}I -T3 (0.05 ng/mL) in a final volume of 350 μL . The incubation time was 24 h at 4°C. Bound and free T3 was separated by adding 0.5%

charcoal-dextran and centrifuging at 1,000g for 30 min at 4°C. Both fractions were measured in a γ radiation counter. All samples were measured in duplicate in the same assay. Results are expressed as ng/dL.

EIA. Tumor T3 levels were measured by EIA. The tumors were homogenized in cold methanol containing 1 mmol/L propylthiouracil for thyronine extraction. Homogenates were centrifuged at 1,500g for 10 min at 4°C, and supernatants were evaporated at 65°C. Precipitates were resuspended in 200 μL hypothalamic serum and stored at -20°C . The assay contained sample or standards (0.75 to 10 ng T3/mL) and anti-T3 antibody conjugated to HRP in a final volume of 200 μL . The incubation time was 1 h at room temperature. Tetramethylbenzidine was added and, 20 min later, the reaction was stopped with HCl. Absorbance was measured at 450 nm. The results are expressed as ng T3/g tissue.

ELISA. Human VEGF secretion was quantified in cell culture supernatants by ELISA. Biotinylated monoclonal mouse antibody detects the human secreted isoforms VEGF 121 and VEGF 165. The assay contained sample or standards from 8.0 to 6,000 pg/mL and anti-VEGF antibody conjugated to HRP-streptavidin. Total protein in the culture medium

was estimated by the Bradford protein assay. Data are expressed as picograms VEGF/mg protein.

Real-time PCR. Gene expression was analyzed by real-time PCR. Total RNA was isolated from the tumors by using TRIzol Reagent (Life Technologies). Synthesis of cDNA was performed with 2 µg total RNA using the Superscript II system. PCR was performed on the sequence detector system Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) using Maxima SYBR green/Rox PCR mix as an indicator for DNA amplification. The reaction was performed with 1 µL cDNA template by using 40 cycles of three-step amplification and the gene-specific primers (Table 1). PCR generated only the expected amplicon, which was demonstrated in each case by electrophoresis of the PCR product through a 3% agarose gel containing ethidium bromide in Tris-acetic acid-EDTA buffer. No PCR products were observed in the absence of template. Relative expression of the genes was calculated by using a standard curve and normalized to β -actin expression. The coefficient of variation for β -actin was <12% in all conditions.

Immunohistochemistry for SYP and VEGF proteins. Briefly, paraffin tissue sections were deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was done by adding 0.05% citraconic anhydride solution, pH 7.4, and heating in a pressure cooker for 25 min. Sections were blocked with peroxidase block solution and then incubated overnight at 4°C with anti-SYP or anti-VEGF antibodies (both, 1:100). Slides were then incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG-HRP or goat anti-mouse IgG-HRP [both, 1:1,000]) at 37°C for 1 h. SYP and VEGF proteins were visualized with DAB. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted in Entellan® solution. Adrenal tissue was processed and used as positive control. Tissues incubated without primary antibodies were used as negative controls. Images were acquired with a camera (Leica DFC 420) and analyzed

under light microscopy (Leica DM 2500) at 100×.

Immunoblotting of CREB and pCREB. Protein extracts (25 or 50 µg per lane) were resolved through 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting. Membranes were washed with Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.5) and blocked with 5% nonfat milk in TBS + 0.05% Tween 20 (TBST) for 2 h at room temperature. Membranes were washed three times with TBST (10 min) and incubated overnight at 4°C with specific antibodies against CREB or pCREB (both 1:1,000). Membranes were washed three times with TBST (10 min) and then incubated with the goat anti-rabbit IgG-HRP (1:5,000) for 2 h at room temperature. Detection was performed using an ECL system. The membranes were analyzed by densitometry using ImageJ 1.43u software. pCREB levels were normalized to total CREB.

Statistical Analysis

Data are reported as mean ± standard error of the mean (SEM). Tumor incidence was analyzed by using a χ^2 test. Homogeneity of variances was determined by Bartlett and Brown-Forsythe tests. Data with normal distribution were analyzed using one- or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey *post hoc* test. Data with non-parametric distribution were analyzed with a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn *post hoc* test. Values with *p* < 0.05 were considered statistically significant. The statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software).

RESULTS

Body Weight, Incidence and LNCaP Tumor Growth

Treatments with ISO, T3 or ISO + T3 did not significantly affect the body weight (Figure 1A), but they modified the incidence and growth of tumors (Figures 1B, C). The data show that

100% of the control mice treated with ISO or ISO + T3 developed tumors, whereas only 85% of the T3-treated mice developed them. ISO and ISO + T3 groups showed a tumor latency of 2 wks, whereas in control and T3 groups, the tumors appeared by wk 3. Rapid tumor growth occurred between the fourth and sixth week in the control group (Figure 1C). In contrast, tumors in the T3, ISO and T3 + ISO groups grew more slowly and were smaller at 6 wks of treatment. The lowest growth was observed in the ISO groups (ISO and ISO + T3).

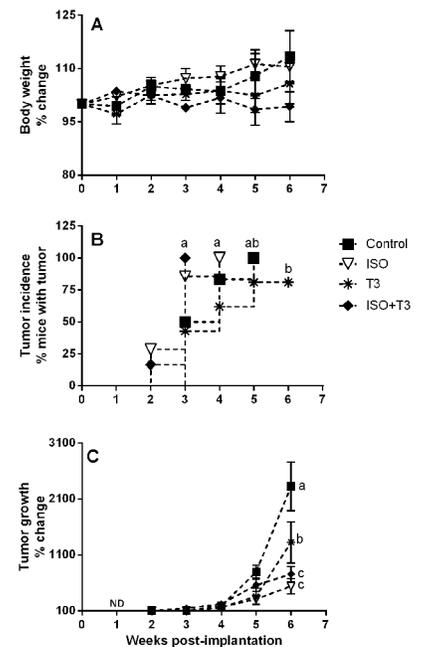


Figure 1. Body weight, tumor incidence and growth. Mice were treated with ISO (200 µg/d), T3 (2.5 µg/d) or both for 6 wks. Body weight (A) and tumor growth (C) are reported as percent change relative to initial weights. Tumor incidence (B) and tumor growth were registered every week. Data are reported as mean ± SEM. Body weight and tumor growth were analyzed by two-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests. Tumor incidence was analyzed by a χ^2 test. Different letters show differences with *p* < 0.05. There were no significant differences in body weight. n = 6 mice/group. ND, not detectable.

T3 Levels and Gene Expression Associated with Thyroid Response in LNCaP Tumors

ISO administration did not modify serum and tumor levels of T3, but T3 supplementation increased both parameters by 20–30%, compared with the control group (Figure 2A). Figure 2B shows the effects of treatments on the expression of genes associated with the availability and response to T3: monocarboxylate transporter 8 (*MCT-8*), type 1 deiodinase (*D1*), type 3 deiodinase (*D3*), thyroid nuclear receptor (*TR-β1*) and a T3-responsive gene of prostate epithelium, the α -spliced isoform of androgen receptor associated protein 70 (*ARA70 α*). In comparison with the control group, ISO significantly reduced *D3* expression by 60%, but it did not affect the other genes. T3 treatment increased *D1* and *ARA70 α* expression by 40 or 50%, but had no effect on the *MCT-8* transporter or *D3* expression. Compared with the control group, an evident but nonsignificant decrease in *TR-β1* (60%) was observed in response to T3. In the combined group (ISO + T3), the low expression of *D3* is consistent with the reduction mediated by ISO. On the other hand, ISO antagonized the decrease in *TR-β1* expression associated with T3, but it did not antagonize the T3-induced increase of *ARA70 α* .

Gene Expression Associated with NE Differentiation and Cell Invasion in LNCaP Tumors

Figure 3 shows the expression of typical genes of prostate epithelium (A), NE differentiation (B) and cell invasion (C). ISO doubled or tripled expression of the androgen receptor (*AR*), survivin, chromogranin A (*CgA*), neuron-specific enolase (*NSE*), urokinase plasmin activator (*uPA*), *VEGF* and metalloproteinase-9 (*MMP-9*) genes, and it reduced by three-fold the expression of the β 2-adrenergic receptor (*ADR-β2*) compared with the control group. The increase of *p27^{kip}* by ISO was not

significant. T3 alone did not modify the basal expression of these genes, but it prevented the up- or downregulation induced by ISO.

Representative images of SYP and VEGF proteins immunodetected in LNCaP tumors are shown in Figure 4. Higher

numbers of SYP- and VEGF-positive cells were observed on tumors of the ISO group compared with those of the control or T3 groups. T3 alone did not affect the levels of these proteins, but it prevented the increases mediated by ISO. Both markers were evident in the positive

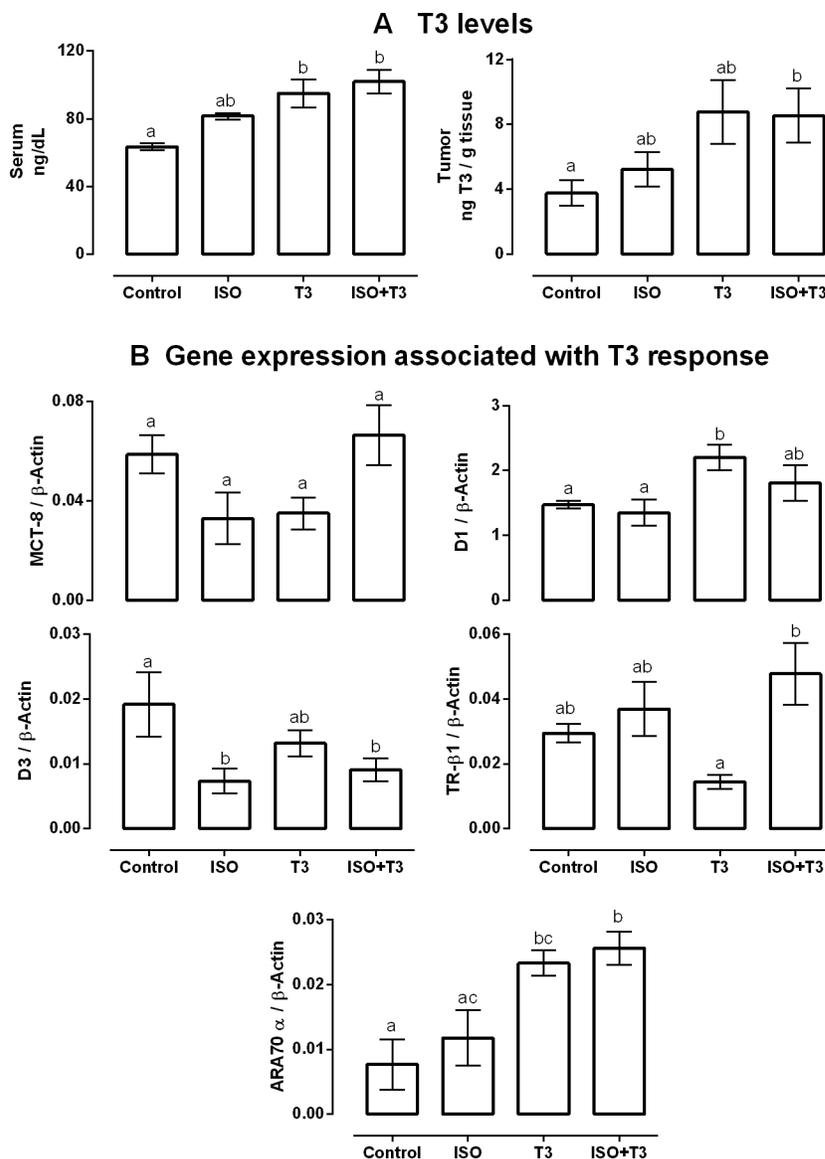


Figure 2. T3 levels and gene expression related to the thyroid response in LNCaP tumors. (A) Serum and tumor levels of T3 were measured by RIA and EIA, respectively. (B) mRNA levels were quantified by real-time PCR. Data are reported as mean \pm SEM. Serum and tumor T3 levels were analyzed by Kruskal-Wallis and *post hoc* Dunn tests. Gene expression data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey *post hoc* tests. Different letters show differences with $p < 0.05$. There were no significant differences in the *MCT-8* transporter. $n = 5$ –6 samples/group, each analyzed in duplicate.

Gene expression in LNCaP tumors

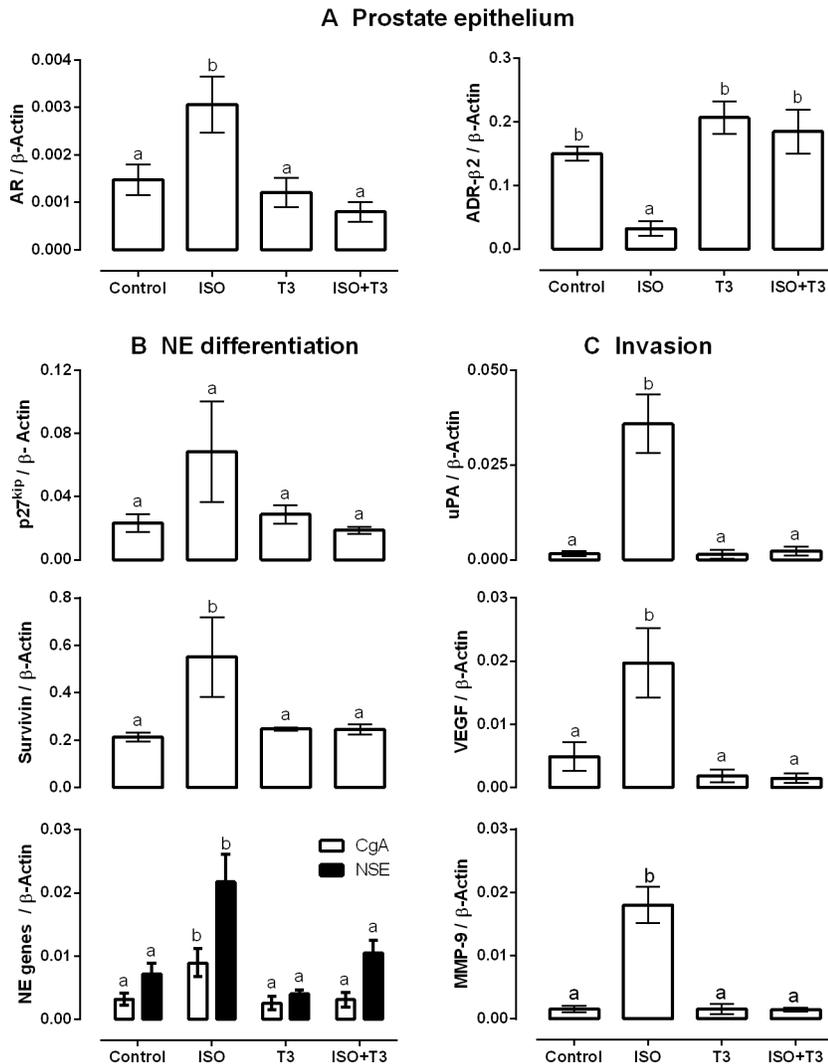


Figure 3. Expression of prostate epithelium (A), NE differentiation (B) and cell invasion (C) in LNCaP tumors. mRNA levels were analyzed by real-time PCR. Data are reported as mean \pm SEM. *p27^{kip}* was analyzed by Kruskal-Wallis and *post hoc* Dunn tests, and the rest of the genes were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests. Different letters show differences with $p < 0.05$. There were no significant differences in *p27^{kip}*. $n = 5-6$ samples/group, each analyzed in duplicate.

control (adrenal medulla), and no signal was observed in the negative controls.

NE Differentiation and Cell Invasion in Human Prostate Cancer Cell Lines

Studies in LNCaP and DU145 cells were carried out to determine if the increases of gene expression and tumor proteins are associated with the

acquisition of neurite-like projections and invasive properties. We also included a T4-treated group to test the effects of both thyronines on these processes. Figure 5A shows that compared with the control group, ISO consistently increased, by 30–40%, the length and number of neurite-like processes, VEGF secretion and cell invasion in LNCaP cells. T3 itself

did not modify any of these parameters, but it prevented the morphological changes and invasive capacity induced by ISO. Similar to ISO, T4 also increased the length and number of neurite-like projections, VEGF secretion, as well as cell invasion. The coadministration of ISO and T4 did not stimulate the acquisition of neurite-like projections or the invasive capacity, but additively stimulated VEGF secretion. In relation to DU145 cells, Figure 5B shows that ISO did not induce the acquisition of neurite-like projections or the invasive capacity, and the apparent increase in VEGF secretion was not significant. None of these parameters were modified by T3 or T4, but a nonsignificant decrease in VEGF secretion was observed in the ISO + T4 group compared with the ISO group.

Levels of total and phosphorylated CREB proteins were evaluated as a first approach to analyze the mechanism by which T3 reduces ISO-stimulated invasiveness in LNCaP cells. Figure 5C shows an evident but nonsignificant increase in the pCREB/CREB ratio by ISO and ISO + T3, in comparison with the control or T3 group.

DISCUSSION

This study supports the notion that sustained β -adrenergic activation promotes the tumorigenic process (induction of NE differentiation and cell invasion), and it shows that T3 but not T4 attenuates prostate cancer progression.

In nude mice engrafted with LNCaP cells, ISO-induced β -adrenergic activation reduced tumor growth but accelerated the latency and incidence of tumors. These data were not surprising, since robust studies show that sympathetic input (via β -adrenergic receptors) is crucial for the initiation and progression of prostate and hepatic cancer (12,36,37). The decrease in tumor growth by ISO was associated with an increased expression of genes related to cell arrest (*p27^{kip}*), NE differentiation (*survivin*, *CgA* and *NSE*) and cell invasion (*VEGF*, *uPA* and *MMP-9*) (8,38–43). With the exception of VEGF and survivin, all these genes contain

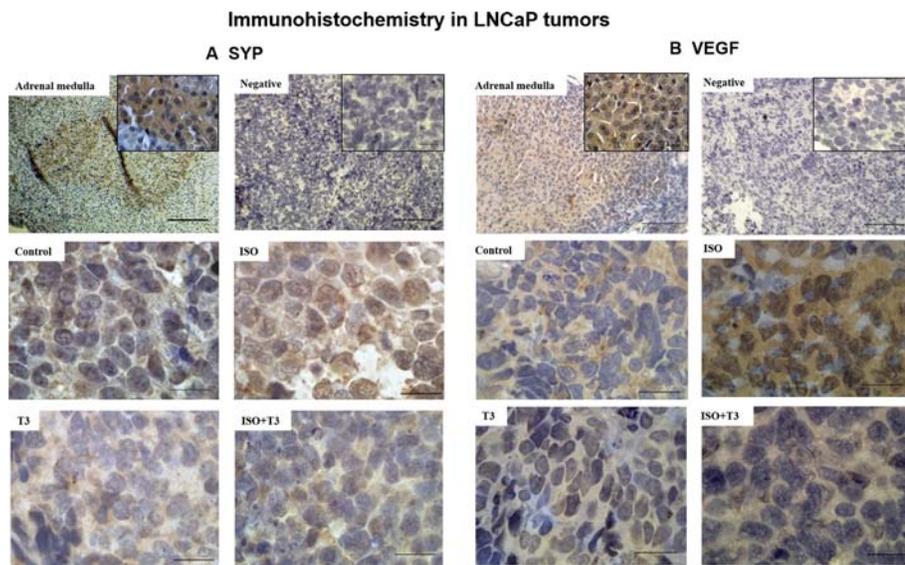


Figure 4. Immunodetection of SYP and VEGF proteins in LNCaP tumors. Representative light microscopy micrographs show immunostaining for SYP (A) and VEGF (B) at 100 \times magnification. Cell nuclei were counterstained with hematoxylin. Adrenal medulla was used as a positive control for both markers, and a tumor xenograft incubated with PBS instead of primary antibody was used as negative control. Insets, 20 \times magnification. Scale bars, 20 μ m.

CRE sites (40,42,44–46), suggesting a direct regulation by the transcription factor pCREB. In addition to gene expression, our data indicated high protein levels of SYP (another marker of NE differentiation) and VEGF in ISO-stimulated prostate tumors. These findings correlate with our *in vitro* data. Acquisition of neurite-like projections, VEGF secretion and invasive potential were consistently increased in ISO-treated LNCaP cultures. The dual effects of ISO are decreased tumor growth and increased invasive capacity; these effects are consistent with the evidence that adrenaline or noradrenaline act by β -adrenergic mechanisms to reduce cell proliferation but promote acquisition of the NE phenotype and/or invasiveness in prostate cancer cells (8,11). Together, our data support the notion that β -adrenergic activation promotes prostate cancer progression through increasing NE differentiation and invasive potential (8,11). Mechanistically, it has been established that PKA activation and/or exchange protein activated by cAMP (EPAC) are crucial

processes for NE differentiation (47). PKA directly induces the inactivation of an apoptotic factor (phosphorylation of BAD) (9), and it indirectly stimulates VEGF secretion (PI3K/AKT/hypoxia inducible factor-1 α [HIF-1 α]) (48) and neurite outgrowth by cytoskeleton rearrangements (inhibition of Ras homolog gene family A [RhoA]/Rho-associated protein kinase [ROCK]) (49). PKA also induces the phosphorylation of CREB and the expression of cell survival factors (Bcl-2), metalloproteases and NE peptides (NSE, CgA, SYP, neurotensin and so on) (8,9,36). Along this line, our data confirm an association between acquisition of the NE phenotype and high levels of pCREB in ISO-treated LNCaP cells. We did not analyze EPAC/p38-MAP kinase activation, but it is known that this intermediate effector is related to cell arrest in pheochromocytoma cells (47).

Our data indicate that responsiveness to β -adrenergic stimulation may depend on the state of differentiation and/or invasive potential of the prostate cancer cells. Compared to LNCaP cells, the

highly invasive DU145 cells were less sensitive to β -adrenergic stimulation; ISO increased VEGF secretion but not the outgrowth of neurites or the invasive capacity. In agreement, a study showed that stimulation with dibutyryl-cAMP or activators of PKA does not, by itself, promote NE differentiation; instead, it increases the efficiency of epidermal growth factor in inducing the NE phenotype (50). However, this low responsiveness contrasts with other studies showing that β -adrenergic activation increases or reduces the invasive capacity in DU145 cells. It has been reported that treatment with 10 μ mol/L norepinephrine (in the presence of 10 μ mol/L propranolol) stimulates cell migration and epithelial–mesenchymal transition (51), whereas in another study, stimulation with 100 μ mol/L ISO reduced cell motility by 50% (52). These differences could not be explained by the dose and/or time of exposure to β -agonists, and it is evident that more studies are required to understand the effect of β -adrenergic receptors on the invasiveness of DU145 cells. It is interesting to note that, unlike β -adrenergic signaling, other signals such as androgen deprivation (PI3K/AKT/MAPK) (53), cytokines (PI3K/signal transducer and activation of transcription [STAT]) (54) and growth factors induce NE differentiation, not only in prostate cancer cells with low invasive potential, but also with high invasive potential (55,56).

In relation to T3, our models showed that T3 supplementation reduced tumor growth and either up- or downregulated the expression of genes associated with the thyroid response. In contrast, T3 had no effect on tumor incidence, basal expression of CRE-dependent genes, acquisition of NE phenotype or invasiveness. T3 supplementation increased *D1* and *ARA70 α* mRNA levels and decreased *TR- β 1* mRNA levels. This result is not surprising, since these genes contain TRE sequences in their regulatory regions (57–59). The high levels of *D1* expression induced by T3 are consistent with the positive feedback loop of the

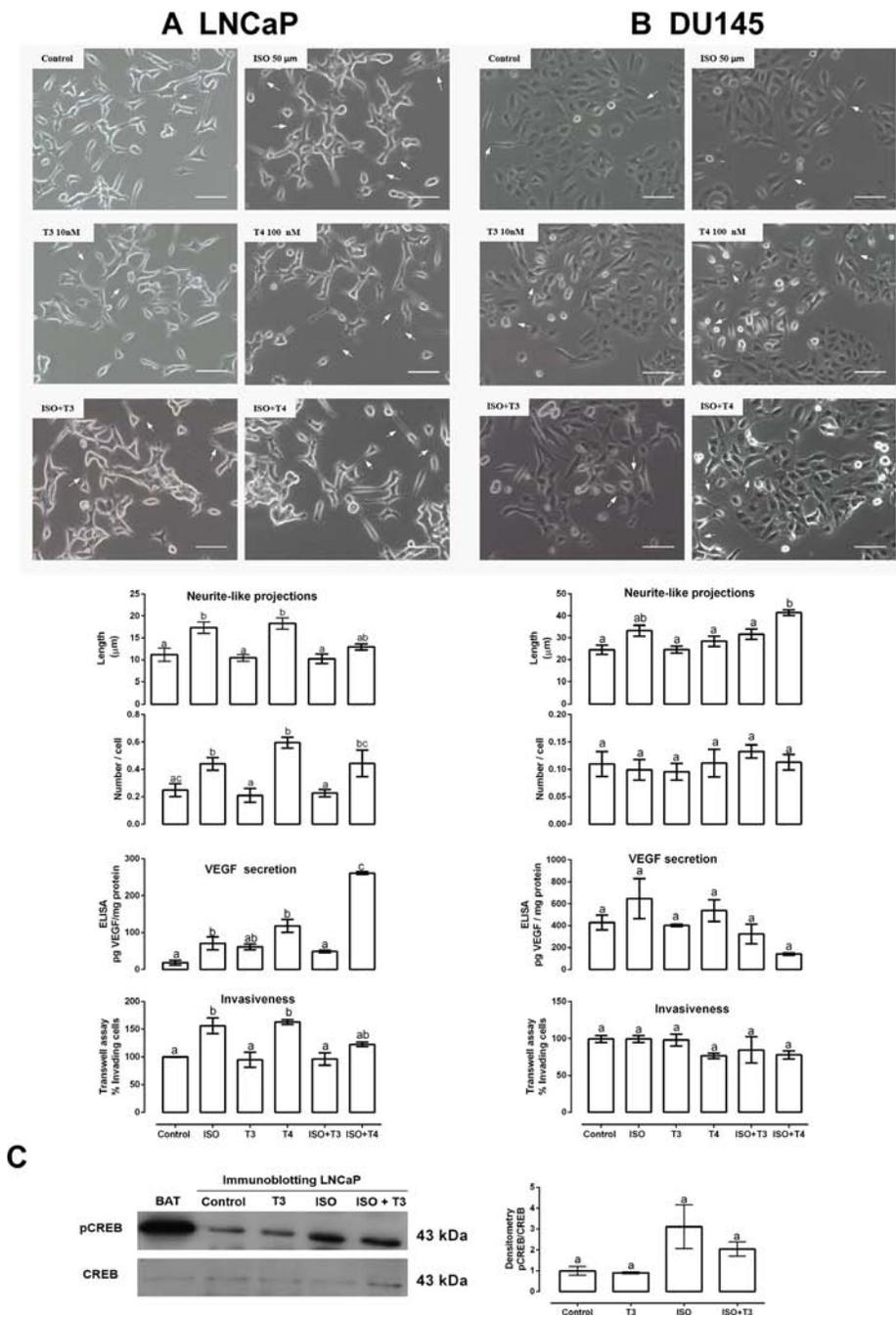


Figure 5. NE phenotype, VEGF secretion and invasive capacity of LNCaP (A) and DU145 cells (B). Cells were treated for 6 d (LNCaP) or 4 d (DU145), with 50 $\mu\text{mol/L}$ ISO, 10 nmol/L T3 or 100 nmol/L T4 and their respective combination with ISO. (A) Representative images by phase contrast microscope at 20x showing the presence of neurite-like projections (see arrows). Scale bar, 50 μm . (C) Representative immunoblot of pCREB and CREB and densitometric quantification in LNCaP cells. Brown adipose tissue (BAT) of cold-exposed rats was used as a positive control for pCREB. All data represent mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests. Different letters indicate differences with $p < 0.05$. $n = 3\text{--}5$ independent experiments.

thyroid response (60). Tumor D1 activity was not measured, but previous studies have shown a direct correlation between enzyme activity (deiodination) and T3 generation in normal prostate tissue (35). T3 supplements also increased the expression of *ARA70 α* , a prostate epithelium T3-responsive gene; *ARA70* is reduced in prostate cancer cells, but its overexpression induces apoptosis and reduces the cell-invasive capacity (61). Our data do not allow us to identify a potential role for T3 in the function of *ARA70*, but there is evidence that *ARA70 α* might inhibit T3 signaling (58). D1, the other TRE-dependent gene, was not inhibited by *ARA70*. Studies are necessary to understand the bidirectional effects of T3 and *ARA70*. The reduced tumor growth associated with T3 could be explained by indirect mechanisms, because *in vitro* studies show that T3 directly increases cell proliferation by decreasing the expression of a p53 target, the B-cell translocation protein (28,62). Additional studies are required to understand the direct or indirect effects of T3 on tumor prostate growth.

In contrast to the lack of T3 effects on invasiveness, T4 promoted neurite outgrowth, VEGF secretion and the invasive capacity of LNCaP cells. Although the signaling pathways of T4 were not analyzed in this study, it is highly probable that activation of the $\alpha\text{v}\beta3$ integrin/MAPK pathway mediates the extension and proliferation of neurites, on the basis of the following evidence: (a) T4 activates the MAPK pathway by interacting with the $\alpha\text{v}\beta3$ -integrin receptor (63); (b) 10 nmol/L T4, but not 10 nmol/L T3, induces the elongation of neurites in cerebellar neurons by activating integrin receptors (64); and (c) MAPK activation is required for neurite outgrowth in pheochromocytoma cells (65). In addition, increased VEGF secretion and invasiveness was observed in T4-treated LNCaP cells. A study in glioma cells showed that 100 nmol/L T4 increased mRNA *HIF- α 1* levels (inductor of VEGF) by an interaction with the $\alpha\text{v}\beta3$ /Src/PI3K pathway (20). Our data agree with this finding and

suggest that non-genomic mechanisms could be involved in these T4 responses.

Our data show that neither T4 nor T3 had effects on neurite outgrowth, VEGF secretion or the invasiveness of DU145 cells; nevertheless, these cells also express the integrin receptor subunits αv and $\beta 3$ (66). Detailed studies are required to analyze the functionality of the $\alpha v\beta 3$ receptor/signaling pathway in these cells. For instance, it has been reported that integrin $\alpha v\beta 3$ recycling (mediated by protein kinase D) is crucial for endothelial cell migration (67), and an alteration at this level could explain the unresponsiveness in DU145 cells. Together, our data indicate that the differential effects of thyronines seem to depend on the state of differentiation and/or the invasiveness of cancer cells.

One of the most important findings of this work is that T3, but not T4, prevented the tumorigenic progression mediated by β -adrenergic stimulation in LNCaP cells. As mentioned before, T3 treatment did not modify the basal expression of CRE-dependent genes, but it prevented the upregulation stimulated by ISO. In the combined group, T3 impeded the increases of tumor proteins SYP and VEGF; and *in vitro*, T3 prevented VEGF secretion, neurite-like outgrowth and invasive capacity. It is well established that T3 acts synergistically with β -adrenergic pathways to upregulate genes that contain both CRE and TRE sites (68,69), but there is also evidence that T3 represses the expression of genes that have only CRE sites (29,70,71). The lack of TRE sites on genes associated with NE differentiation and cell invasion can explain the null effect of T3 on the basal expression of these genes, suggesting that T3 acts indirectly in the ISO response. Studies have demonstrated a protein-protein interaction between nuclear thyroid hormone receptors and CREB in the presence of T3 (a T3-TR-CREB complex), reducing the ability of PKA to phosphorylate CREB (29,70). In our study, T3 did not fully prevent the phosphorylation of CREB, suggesting that the antagonistic

effect of T3 on the β -adrenergic pathway does not necessarily occur primordially at this level. For instance, in myocytes, T3 inhibits the expression of the L-type calcium channel gene, thereby inhibiting the nuclear translocation of pCREB (71). Another possibility is that T3 inhibits other downstream effectors of the β -adrenergic pathway associated with tumor progression, such as EPAC, erythroid transcription factor (GATA1) or activator-protein 1 (AP1) (72). Ongoing studies by our group are analyzing the antagonist effect of T3 on the β -adrenergic pathway. Neither T3 alone nor T3 combined with ISO had any effect on the tumorigenic response of DU145 cells. As mentioned before, this unresponsiveness could be related to the dedifferentiated state and/or the invasive capacity of these cells. TR β 1, the nuclear thyroid receptor, has been identified in both LNCaP and DU145 cells (29); however, T3 exerts proliferative effects only in LNCaP cells (27,62). Overall, our data *in vitro* and *in vivo* indicate that T3 restrains cancer progression mediated by β -adrenergic receptors in a model of differentiated cancer. T4 exacerbated the protumorigenic effects of ISO (VEGF secretion) in LNCaP cells, but did not have any effect on DU145 cells. Possible crosstalk between β -adrenergic signaling and T4-induced activation of MAPK could explain this overresponse in LNCaP cells; however, this relationship seems to be complex and is not yet clear. Clinical and experimental studies have shown that chronic systolic and/or diastolic hypertension, which are associated with a high mortality risk in prostate cancer, are also accompanied by lower levels of free T4 and T3 (2,73,74). Antagonistic T3 effects on β -adrenergic signaling are consistent with the notion that synergism is lost when one of these systems is enhanced or depressed; nevertheless, meticulous studies are needed to analyze if changes in the ratio of T4/T3 could be relevant for prostate cancer progression. Indeed, epidemiological data suggest that higher T4 levels increase the risk of prostate cancer (75), and our study

shows that a moderate and continuous dose of T3, but not T4, might prevent or delay tumor progression in a condition of adrenergic hyperactivity. Moreover, basic and clinical studies support the proposal that emotional, behavioral and surgical stresses, which depress the thyroid axes, accelerate prostate cancer progression (76,77). Oncologists should consider this fact, because the failure of some therapies could be related to the high anxiety levels of cancer patients. It would be interesting to analyze if a moderate dose of T3 given to prostate cancer patients could counteract the high central sympathetic input associated with hypothyroidism and whether this supplement might improve the efficacy of antineoplastic treatments. Indeed, a study found that pretreatment with supraphysiological doses of T3 enhances the effectiveness of chemotherapy in breast cancer cells (78).

CONCLUSION

Our study made consistent and complementary findings in LNCaP tumors and LNCaP cultures. We showed that the β -adrenergic pathway and thyroid hormones exert differential effects, stimulating or inhibiting prostate cancer progression. The protective effects of T3 against acquisition of the NE phenotype and cell invasion induced by β -adrenergic activation are associated with a pCREB-independent mechanism. Further studies are required to analyze the possible significance of the T4/T3 ratio for predicting prostatic cancer development.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CONACYT (127368, 235961, 176911) and PAPIIT-UNAM (202513, 200813). E Delgado-González is a student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México and received a fellowship from CONACYT (202474) and PAPIIT (202513). AA Sánchez-Tusie received a postdoctoral fellowship from CONACYT (235961). The authors thank

María Juana Cárdenas, Martín García and Alejandra Castilla for their technical assistance; Erika Rendón and Berenice Salas (FM-UNAM) for their advice on the cell migration assays; Ramón Martínez, Omar González and Sandra Hernández for computer assistance; Francisco Valles for bibliographical assistance, Leonor Casanova and Lourdes Lara for academic support; and Dorothy Pless for proof-reading.

DISCLOSURE

The authors declare that they have no competing interests as defined by *Molecular Medicine*, or other interests that might be perceived to influence the results and discussion reported in this paper.

REFERENCES

1. Center MM, et al. (2012) International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur. Urol.* 61:1079–92.
2. Gann PH, Daviglus ML, Dyer AR, Stamler J. (1995) Heart rate and prostate cancer mortality: results of a prospective analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4:611–6.
3. Lu H, et al. (2015) Impact of beta-blockers on prostate cancer mortality: a meta-analysis of 16,825 patients. *Onco. Targets Ther.* 8:985–990.
4. Harris AM, et al. (2007) Effect of alpha1-adrenoceptor antagonist exposure on prostate cancer incidence: an observational cohort study. *J. Urol.* 178:2176–80.
5. Rao J, et al. (2008) Hypothetic association between greater sympathetic activity and prostate cancer. *Med. Hypotheses.* 71:442–3.
6. Ganesh B, Saoba SL, Sarade MN, Pinjari SV. (2011) Risk factors for prostate cancer: a hospital-based case-control study from Mumbai, India. *Indian J. Urol.* 27:345–50.
7. Grytli HH, Fagerland MW, Fosså SD, Taskén KA. (2014) Association between use of beta-blockers and prostate cancer-specific survival: a cohort study of 3561 prostate cancer patients with high-risk or metastatic disease. *Eur. Urol.* 65:635–41.
8. Cox ME, Deeble PD, Lakhani S, Parsons SJ. (1999) Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59:3821–30.
9. Sastry KR, et al. (2007) Epinephrine protects cancer cells from apoptosis via activation of cAMP-dependent protein kinase and BAD phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282:14094–100.
10. Zhang P, He X, Tan J, Zhou X, Zou L. (2011) beta-Arrestin2 mediates beta-2 adrenergic receptor signaling inducing prostate cancer cell progression. *Oncol. Rep.* 26:1471–7.

11. Palm D, et al. (2005) The norepinephrine driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int. J. Cancer.* 118:2744–9.
12. Magnon C, et al. (2013) Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science.* 341:123361.
13. Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. (1995) Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Hum. Pathol.* 26:167–70.
14. Grigore AD, Ben-Jacob E, Farach-Carson MC. (2015) Prostate cancer and neuroendocrine differentiation: more neuronal, less endocrine? *Front. Oncol.* 5:37.
15. Ramberg H, et al. (2008) Hormonal regulation of beta-2 adrenergic receptor level in prostate cancer. *Prostate.* 68:1133–42.
16. Hassan S, et al. (2014) A pilot study of blood epinephrine levels and CREB phosphorylation in men undergoing prostate biopsies. *Int. Urol. Nephrol.* 46:505–10.
17. di Sant’Agnese PA. (1992) Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer.* 70:254–68.
18. Papandreou CN, et al. (2002) Results of a phase II study with doxorubicin, etoposide, and cisplatin in patients with fully characterized small-cell carcinoma of the prostate. *J. Clin. Oncol.* 20:3072–80.
19. Moriggi G, et al. (2011) Thyroid hormones (T3 and T4): dual effect on human cancer cell proliferation. *Anticancer Res.* 31:89–96.
20. Lin HY, et al. (2009) L-Thyroxine vs. 3,5,3’-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:C980–1.
21. Pinto M, Soares P, Ribatti D. (2011) Thyroid hormone as a regulator of tumor induced angiogenesis. *Cancer Lett.* 301:119–26.
22. Mousa SA, O’Connor L, Davis FB, Davis PJ. (2006) Proangiogenesis actions of the thyroid hormone analog 3,5-diiodothyropropionic acid (DITPA) is initiated at the cell surface and is integrin mediated. *Endocrinology.* 147:2602–7.
23. Perez-Juste G, Aranda A. (1999) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 274:5026–31.
24. Sar P, Peter R, Rath B, Mohapatra AD, Mishra SK. (2011) 3,3’,5’ Triiodo L thyronine induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells, repressing SMP30 expression through negative thyroid response elements. *PLoS One.* 6:e20861.
25. Perra A, Kowalik MA, Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Columbano A. (2009) Thyroid hormone receptor ligands induce regression of rat preneoplastic liver lesions causing their reversion to a differentiated phenotype. *Hepatology.* 49:1287–96.
26. Zhang S, et al. (1999) Interactive effects of triiodothyronine and androgens on prostate cell growth and gene expression. *Endocrinology.* 140:1665–71.

27. Hsieh ML, Juang HH. (2005) Cell growth effects of triiodothyronine and expression of thyroid hormone receptor in prostate carcinoma cells. *J. Androl.* 26:422–8.
28. Tsui KH, Hsieh WC, Lin MH, Chang PL, Juang HH. (2008) Triiodothyronine modulates cell proliferation of human prostatic carcinoma cells by downregulation of the B-cell translocation gene 2. *Prostate.* 68:610–9.
29. Fukuyama K, et al. (2006) Thyroid hormone inhibits vascular remodeling through suppression of cAMP response element binding protein activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26:2049–55.
30. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. (1999) *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.* Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De Medicina. National Academy Press, Washington (DC). English version, 1996. Available from: <http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/10/Gu%C3%ADa-para-el-Cuidado-y-Uso-de-los-Animales-de-Laboratorio.pdf>.
31. Berthonneche C, et al. (2009) Cardiovascular response to beta-adrenergic blockade or activation in 23 inbred mouse strains. *PLoS One.* 4:e6610.
32. Henderson KK, et al. (2009) Physiological replacement of T3 improves left ventricular function in an animal model of myocardial infarction-induced congestive heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2:243–52.
33. Thompson HJ. (2000) Methods for the induction of mammary carcinogenesis in the rat using either 7,12-dimethylbenz(a)anthracene or 1-methyl-1-nitrosourea. In: *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research.* Ip MM, Asch BB (eds.) Klumer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 19–29.
34. Incerpi S, et al. (2014) Thyroid hormone inhibition in L6 myoblasts of IGF-I-mediated glucose uptake and proliferation: new roles for integrin alpha3beta3. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307:C150–61.
35. Delgado-Gonzalez E, Aceves C, Anguiano B. (2011) Postejaculatory increase of prostatic triiodothyronine (T3) depends on sympathetic innervation in the rat. *Biol. Reprod.* 84:118–23.
36. Braadland PR, Ramberg H, Grytli HH, Taskén KA. (2015) B-adrenergic receptor signaling in prostate cancer. *Front. Oncol.* 4:375.
37. Uehara H, Nakaizumi A, Baba M, Iishi H, Tatsuta M. (1993) Enhancement by isoproterenol of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Int. J. Cancer.* 53:703–6.
38. Pinski J, et al. (2006) Genistein-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Prostate.* 66:1136–43.
39. Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstrahl E, Young CY. (2001) Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. *Prostate.* 48:7–15.
40. Canaff L, et al. (1998) Analysis of molecular mechanisms controlling neuroendocrine cell specific transcription of the chromogranin A gene. *Endocrinology.* 139:1184–96.

41. Lutgendorf S, et al. (2003) Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 9:4514–21.
42. Yang EV, et al. (2006) Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumour cells. *Cancer Res.* 66:10357–64.
43. Guo K, et al. (2009) Norepinephrine induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. *Oncol. Rep.* 22:825–30.
44. Kwon TK, Nagel JE, Buchholz MA, Nordin AA. (1996) Characterization of the murine cyclin dependent kinase inhibitor p27^{kip1}. *Gene.* 180:113–20.
45. Oliva D, Cali L, Feo S, Giallongo A. (1991) Complete structure of the human gene encoding neuron-specific enolase. *Genomics.* 10:157–65.
46. von der Ahe D, Pearson D, Nagamine Y. (1990) Macromolecular interaction on a AMP responsive region in the urokinase plasmin activator gene: a role of protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 18:1991–9.
47. Emery AC, Eiden MV, Eiden LE. (2014) Separate cyclic AMP sensors for neuritogenesis, growth arrest, and survival of neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 289:10126–39.
48. Park SY, et al. (2011) Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1alpha protein-dependent mechanism. *Int. J. Cancer.* 128:2306–16.
49. Jones SE, Palmer TM. (2012) Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell. Signal.* 24:1504–14.
50. Humez S, et al. (2006) Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer.* 13:181–95.
51. Barbieri A, et al. (2015) The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 47:527–34.
52. Yu J, et al. (2007) Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. *Cancer Cell.* 12:419–31.
53. Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ. (2001) Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology.* 142:4795–805.
54. Deeble PD, Murphy DJ, Parsons SJ, Cox ME. (2001) Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Mol. Cell. Biol.* 21:8471–82.
55. Marchiani S, et al. (2010) Androgen-responsive and -unresponsive prostate cancer cell lines respond differently to stimuli inducing neuroendocrine differentiation. *Int. J. Androl.* 33:784–93.
56. Mori R, et al. (2009) Gene profiling and pathway analysis of neuroendocrine transdifferentiated prostate cancer cells. *Prostate.* 69:12–23.
57. Zhang CY, Kim S, Harney JW, Larsen PR. (1998) Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 39:1156–63.
58. Tai PJ, et al. (2007) Direct regulation of androgen receptor associated protein 70 by thyroid hormone and its receptors. *Endocrinology.* 148:3485–95.
59. Suzuki S, Miyamoto T, Opsahl A, Sakurai A, DeGroot LJ. (1994) Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1. *Mol. Endocrinol.* 8:305–14.
60. Gereben B, et al. (2008) Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* 29:898–938.
61. Ligr M, et al. (2010) Tumor suppressor function of androgen receptor coactivator ARA70alpha in prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 176:1891–900.
62. Esquenet M, Swinnen JW, Heyns W, Verhoeven G. (1995) Triiodothyronine modulates growth, secretory function and androgen receptor concentration in the prostatic carcinoma cell line LNCaP. *Mol. Cell. Endocrinol.* 109:105–11.
63. Lin HY, Davis FB, Gordinier JK, Martino LJ, Davis PJ. (1999) Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am. J. Physiol.* 276:C1014–24.
64. Farwell AP, Dubord-Tomasetti SA, Pietrzykowski AZ, Stachelek SJ, Leonard JL. (2005) Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 154:121–35.
65. Fukuda M, et al. (1995) Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. *Oncogene.* 11:239–44.
66. Witkowski CM, Rabinovitz I, Nagle RB, Affinito KS, Cress AE. (1993) Characterization of integrin subunits, cellular adhesion and tumorigenicity of four human prostate cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119:637–44.
67. di Blasio L, Droetto S, Norman J, Bussolino F, Primo L. (2010) Protein kinase D1 regulates VEGF-A-induced alphavbeta3 integrin trafficking and endothelial cell migration. *Traffic.* 11:1107–18.
68. Silva JE, Bianco SD. (2008) Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. *Thyroid.* 18:157–65.
69. Dorsa KK, Santos MV, Silva MR. (2010) Enhancing T3 and cAMP responsive gene participation in the thermogenic regulation of fuel oxidation pathways. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 54:381–9.
70. Méndez-Pertuz M, Sánchez-Pacheco A, Aranda A. (2003) The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO J.* 22:3102–12.
71. Chen WJ, Yeh YH, Lin KH, Chang GJ, Kuo CT. (2011) Molecular characterization of thyroid hormone-inhibited atrial L-type calcium channel expression: implication for atrial fibrillation in hyperthyroidism. *Basic Res. Cardiol.* 106:163–74.
72. Cole SW, Sood AK. (2012) Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin. Cancer Res.* 18:1201–6.
73. Iida M, et al. (2012) Thyroid hormone within the normal range is associated with left ventricular mass in patients with hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* 6:261–9.
74. Weltman NT, et al. (2015) Long-term physiological T3 supplementation in hypertensive heart disease in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309:H1059–65.
75. Mondul AM, et al. (2012) Circulating thyroxine, thyroid-stimulating hormone, and hypothyroid status and the risk of prostate cancer. *PLoS One.* 7:e47730.
76. Wade J, et al. (2013) Psychological impact of prostate biopsy: physical symptoms, anxiety, and depression. *J. Clin. Oncol.* 31:4235–41.
77. Hassan S, et al. (2013) Behavioral stress accelerates prostate cancer development in mice. *J. Clin. Invest.* 123:874–86.
78. Huang J, et al. (2013) Implication from thyroid function decreasing during chemotherapy in breast cancer patients: chemosensitization role of triiodothyronine. *BMC Cancer.* 13:334.

Cite this article as: Delgado-González E, Sánchez-Tusie AA, Morales G, Aceves C, Anguiano B. (2016) Triiodothyronine attenuates prostate cancer progression mediated by β -adrenergic stimulation. *Mol. Med.* 22:1–11.