



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTOS ANTITUMORALES DE LA 6-YODOLACTONA EN UNA LÍNEA
CELULAR DE CÁNCER PROSTÁTICO HUMANO.
PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE
PEROXISOMAS GAMMA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
SUSANA LUCÍA SOSA GALLEGOS

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Instituto de Neurobiología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Maricela Luna Muñoz

Instituto de Neurobiología

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Instituto de Neurobiología

CAMPUS UNAM JURIQUILLA, QRO.

MÉXICO, OCTUBRE 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Los miembros del jurado de examen, certificamos que la tesis elaborada por: Susana Lucía Sosa Gallegos, cuyo título es: “Efectos antitumorales de la 6-yodolactona en una línea celular de cáncer prostático humano. Participación de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología), y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Vocal

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Suplente

Dra. Maricela Luna Muñoz

Suplente

Dr. Francisco Vázquez Cuevas

Este trabajo se realizó en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma Nacional de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano. Tesis financiada por PAPIIT-UNAM (IN202513) y CONACYT (235961, 176911). Susana Sosa recibió una beca CONACYT (221009).

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida para lograr mis metas y cada día ser mejor ser humano.

A toda mi familia por el apoyo incondicional para elaborar este trabajo, la familia es el sentido de mi vida.

A la Dra. Carmen Aceves Velasco por haberme abierto las puertas a su laboratorio y permitirme ser parte de su equipo de trabajo, donde he logrado desarrollarme profesionalmente de manera importante y donde he descubierto mi pasión por la investigación.

A la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano, quien como directora de esta tesis, me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica, con un interés y una entrega que sobrepasaron por mucho, todas las expectativas que como alumna deposité en su persona.

A los sinodales quienes con su excelencia académica enriquecen este trabajo.

A la QFB Guadalupe Delgado en paz descanse, y Biol. Felipe Ortiz, por el apoyo técnico brindado, así como a mis compañeros de laboratorio D-02 (Paloma Olvera, Nuri Aranda, Evangelina Delgado, Silvia Angulo, Elvira Núñez, Yunuen Alfaro, Laura Riverol, Irasema Mendieta, Mario Nava y Alex Bontempo), quienes no sólo me brindaron gran compañerismo sino también conocimiento.

A la M. en C. Leonor Casanova (Unidad de enseñanza), Ing. Ramón Martínez (Unidad de Computo), Dra. Anaid Antaramian y M. en C. Adriana González (Unidad de Proteogenómica) y Dr. Francisco Valles (Biblioteca UNAM, campus Juriquilla).

DEDICATORIA

A mi esposo Arturo Alvarado González, compañero de mi vida y cómplice para el logro de todos mis sueños, quien me potencia para lograr lo que parece imposible. A mis bebés Lucía y Arturito, quienes perdieron mi compañía por ciertos momentos, entendiendo el sacrificio para lograr este trabajo, y a mi madre por todo el esfuerzo que siempre y con amor me ha brindado, reflejo del éxito en mi vida.

RESUMEN

En diversos tipos de cáncer, se ha mostrado que el yodo molecular (I_2) ejerce efectos antitumorales (anti-proliferativos, apoptóticos y anti-invasivos), a través de mecanismos directos (antioxidante) e indirectos (generación de yodolípidos). La 6-yodolactona (6-IL) es un yodolípido que se produce a partir de la yodación del ácido araquidónico (AA). Existen datos de que la 6-IL actúa como ligando de los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ), y se ha propuesto que la activación y señalización de estos receptores, podría ser parte de los mecanismos por los cuales la 6-IL regula la expresión de genes antitumorales. El antecedente directo de este trabajo muestra que el epitelio prostático capta diversas formas químicas de yodo y que el tratamiento con I_2 reduce la proliferación celular e induce apoptosis a través de la vía Bax/caspasas. El propósito del presente estudio fue analizar los efectos antitumorales de la 6-IL exógena, en el epitelio prostático no canceroso (RWPE-1) y canceroso (LNCaP). Se evaluó los efectos de la 6-IL sobre la viabilidad celular y apoptosis y se determinó si estos efectos están mediados por los PPAR γ y/o activación de lipoxigenasas (5, 12, 15-LOX-1). Éstas enzimas generan lípidos con acción protumoral (5-HETE, 12-HETE y 13-HODE) o antitumoral (15-HETE). La viabilidad celular se analizó con el método de exclusión azul tripano y la apoptosis mediante la detección fluorescente de anexina V. La participación de los PPAR γ se determinó mediante el uso de un antagonista específico (GW9662) y de las lipoxigenasas mediante el uso de un inhibidor específico (NDGA). La expresión génica de PPAR γ y 15-LOX-1 se evaluó mediante RT-PCR tiempo real y la actividad de 15-LOX-1 mediante un ensayo enzimático (sistema libre de células). En ambos tipos celulares, la 6-IL disminuyó la viabilidad celular y promovió apoptosis, siendo las RWPE-1 más sensibles que las LNCaP (IC_{50} , 1.2 μ M vs. 20.3 μ M). Estos efectos fueron independientes (RWPE-1) y dependientes de PPAR γ (LNCaP). En ambas líneas celulares, la inhibición de las lipoxigenasas disminuyó la viabilidad celular. En las RWPE-1, esta inhibición no se sumó a los efectos antiproliferativo del I_2 o 6-IL, mientras que en las LNCaP, la inhibición enzimática canceló el efecto antiproliferativo de 6-IL. No obstante, en un sistema libre de células la 6-IL inhibió la actividad de 15-LOX-1. Nuestros datos indican que los efectos de la 6-IL

involucran vías dependientes o independientes de PPAR γ , siendo la inhibición de 15-LOX-1 un posible mecanismo de esto último.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Ácidos grasos y metabolismo del ácido araquidónico	2
2.2. Biosíntesis de eicosanoides	4
2.2.1. Vía de las lipoxigenasas	6
2.2.2. Isoformas de las lipoxigenasas	7
2.2.3. Mecanismo de acción de HETEs y leucotrienos	9
2.3. Ácido araquidónico y la vía lipoxigenasa en el cáncer de próstata	9
2.4. PPAR en el cáncer de próstata	10
2.4.1. Generalidades de PPAR	10
2.4.1.1. Activación de PPAR	11
2.4.1.2. Mecanismos de transrepresión mediados por PPAR	12
2.4.1.3. Ligandos de PPAR y efectos independientes a la activación de PPAR	13
2.4.2. Cáncer de próstata	14
2.5. Yodolípidos y cáncer	14

2.5.1. Patologías prostáticas	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO GENERAL	17
5.1. Objetivos específicos	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1. Materiales y reactivos	18
6.2. Líneas celulares	18
6.3. Diseño experimental	19
6.3.1. Efecto de la 6-yodolactona en la viabilidad celular	19
6.3.2. Efectos del I ₂ y de la 6-yodolactona sobre la viabilidad celular. Participación de PPAR gamma y de las lipoxigenasas	19
6.3.3. Efecto de la 6-yodolactona en la apoptosis	20
6.3.4. Efecto de la 6-yodolactona sobre la expresión génica	20
6.3.5. Efecto de la 6-yodolactona sobre la actividad de 15-Lipoxigenasa-1	20
6.4. Métodos Analíticos	21
6.4.1. Síntesis de la 6-yodolactona	21
6.4.2. Viabilidad celular	21
6.4.3. Análisis de la apoptosis	21

6.4.4. RT-PCR (tiempo real)	22
6.4.5. Ensayo enzimático de 15-Lipoxigenasa-1	23
6.4.6. Análisis estadístico	23
7. RESULTADOS	24
7.1. Síntesis de la 6-yodolactona	24
7.2. Curso temporal de la 6-yodolactona en la viabilidad celular	25
7.3. Cálculo de la concentración media máxima inhibitoria (IC ₅₀) para 6-yodolactona	26
7.4. Efectos del I ₂ y de la 6-yodolactona sobre la viabilidad celular. Participación de PPAR gamma y de las lipoxigenasas	27
7.5. Efecto apoptótico de la 6-yodolactona	29
7.6. Efecto de la 6-yodolactona sobre la expresión génica	30
7.7. Efecto de la 6-yodolactona en la actividad de la 15-Lipoxigenasa-1	31
8. DISCUSIONES	34
9. CONCLUSIONES	40
10. MODELO PROPUESTO	41
11. BIBLIOGRAFÍA	42
12. APÉNDICE	56
12.1. Modelo teórico de la síntesis química de la 6-yodolactona en un ambiente acuoso.	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Participación de la vía lipoxigenasa en el cáncer prostático	10
Cuadro 2. Ligandos naturales y sintéticos de PPAR	11
Cuadro 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para PCR	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ácidos grasos ω -6 y ω -3. Generación de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios	2
Figura 2.	Estructura química del ácido araquidónico	3
Figura 3.	Estructura básica de un fosfolípido y mecanismo de acción de la fosfolipasa cPLA2 α	3
Figura 4.	Vías metabólicas del ácido araquidónico	5
Figura 5.	Mecanismo de acción de las lipoxigenasas	7
Figura 6.	Mecanismo de transcripción génica mediado por PPAR	12
Figura 7.	Mecanismo de transrepresión mediado por PPAR	13
Figura 8.	Imagen representativa de una cromatografía en capa fina	24
Figura 9.	Curso temporal del efecto de la 6-yodolactona en la viabilidad celular	25
Figura 10.	Cálculo de la concentración media máxima inhibitoria (IC ₅₀) para 6-yodolactona	26
Figura 11.	Curva dosis-respuesta de GW9662 en células LNCaP	27
Figura 12.	Efecto de la coadministración del antagonista a PPAR gamma (GW9662) y de un inhibidor de lipoxigenasas en los efectos del I ₂ y 6-IL sobre la viabilidad celular	28
Figura 13.	Efecto de la 6-yodolactona en la apoptosis	29
Figura 14.	Efecto del I ₂ y 6-yodolactona en la expresión de 15-Lipoxigenasa-1 y PPAR gamma	30
Figura 15.	Efecto de la 6-yodolactona y curso temporal de la actividad de	31

la 15-Lipoxigenasa-1

Figura 16.	Cinética de sustrato de la enzima 15-Lipoxigenasa-1	32
Figura 17.	Análisis de la cinética enzimática para sustrato	33
Figura 18.	Características estructurales de anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS)	38
Figura 19.	Modelo propuesto	41

1. INTRODUCCIÓN

El aporte de yodo es crucial en la función de la glándula tiroidea, pues participa en la síntesis de hormonas tiroideas y mantiene la integridad del epitelio glandular. Existen evidencias de que el 30 % de yodo total es de tipo hormonal y que el resto está concentrado en tejidos no-tiroideos. Órganos y tejidos como las glándulas salivales, la glándula mamaria lactante, la mucosa gástrica y el intestino, destacan por su capacidad de captar yodo. Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que la glándula mamaria no-lactante y la próstata captan yodo en cuando menos 2 formas químicas: como yoduro (I^-) y en forma molecular (I_2). En modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer mamario se ha mostrado que la administración continua de I_2 , pero no de I^- (forma reducida), disminuye la incidencia y tamaño de los tumores, a través de inhibir la tasa de proliferación (aumenta p53 y p21, y disminuye ciclina D1) e inducir apoptosis (vía mitocondrial dependiente e independiente de BAX/caspasas). El I_2 también inhibe la expresión de genes asociados a invasión celular, como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). En modelos animales de hiperplasia tiroidea y cáncer mamario, se ha mostrado que la administración continua de I_2 se acompaña de la formación endógena de un intermediario lipídico yodado, denominado 6-yodolactona (6-IL), el cual se genera a partir de la yodación del ácido araquidónico. Además se ha mostrado que la administración exógena de 6-IL reproduce algunos de los efectos antitumorales del I_2 . Existen evidencias de que la 6-IL actúa como ligando de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ), y se ha propuesto que la formación del complejo 6-IL/PPAR podría ser parte del mecanismo a través del cual el I_2 ejerce sus efectos. Como se mencionó, la próstata capta yodo, y el tratamiento con I_2 reduce la proliferación celular e induce apoptosis. Sin embargo, se desconoce si el epitelio prostático responde los efectos de la 6-IL; por lo que el propósito de esta tesis fue analizar los efectos de este yodolípido en la viabilidad celular y apoptosis así como determinar la participación de los PPAR γ de lipoxigenasas en estos procesos. Además, se evaluó el efecto de la 6-IL en la expresión de PPAR γ , así como en la expresión y actividad de la enzima 15-lipooxigenasa-1 (generación de lípidos pro-tumorales a partir del ácido araquidónico).

2. ANTECEDENTES

2.1. Ácidos grasos y metabolismo del ácido araquidónico

Los ácidos grasos libres esenciales, son compuestos alifáticos de cadena larga que se obtienen a partir de la dieta. La cadena puede ser saturada o insaturada y tener una extensión de 4 a 29 carbonos. Los ácidos grasos además de ser una importante fuente de energía, actúan como mensajeros celulares, activando vías de señalización. En vertebrados predominan los poli-insaturados del tipo omega 6 (ω -6) y omega 3 (ω -3). La denotación ω -6 y ω -3, hace referencia al número de carbono terminal a partir del cual se localiza el primer doble enlace. Estudios epidemiológicos en humanos sustentan la noción que una ingesta dietética rica en ω -6 (ácido linoleico, ácido γ linolénico, ácido araquidónico [AA]) apoya la progresión a cáncer, a través de la generación de metabolitos con efectos proliferativos y pro-inflamatorios, mientras que el consumo alto de ω -3 (ácido α linolénico, ácido eicosapentaenoico [EPA] y ácido docohexanoico [DHA]) previene dicha progresión a través de la producción de metabolitos anti-proliferativos y anti-inflamatorios (Meng et al., 2013) (Figura 1).

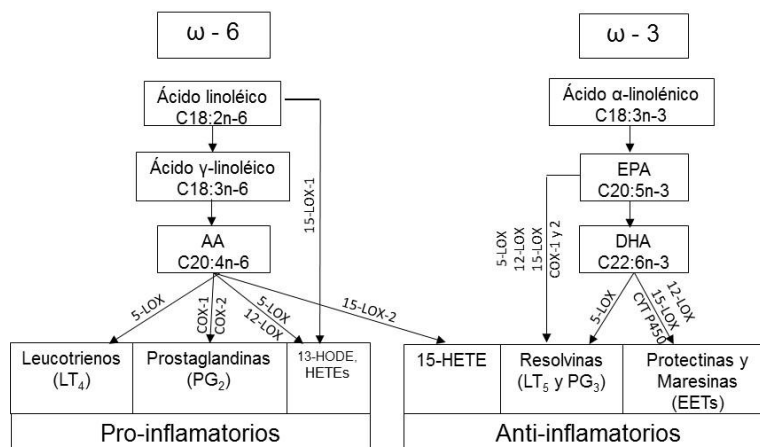


Figura 1. Ácidos grasos ω -6 y ω -3. Generación de mediadores pro- y anti-inflamatorios. El ácido linoleico actúa como precursor del ácido araquidónico (AA), mientras que el ácido α -linolénico actúa como precursor del ácido docohexanoico (DHA). Los leucotrienos y HETEs son generados por la vía de las lipoxigenasas, mientras que las prostaglandinas son generadas por la vía de las ciclooxygenasas. Los EETs (ácidos grasos epoxieicosatrenoicos) son generados primordialmente por la vía citocromo P450. Modificado de: Duvall y Levy 2015.

En la Figura 2 se muestra la estructura del AA, el cual está constituido por una cadena de 20 carbonos y cuatro dobles enlaces (20:4). Se sintetiza a partir de ácido linoléico de 18 carbonos y dos dobles enlaces (18:2) a través de un proceso de elongación-desaturación. El AA forma parte del 25 al 30 % de los fosfolípidos de membrana y entre sus funciones destaca mantener la fluidez de esta. La disponibilidad de AA libre depende de la activación de la fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de calcio (cPLA₂α), la cual hidroliza la unión *sn2* de los fosfolípidos (Figura 3). Este lípido en su forma libre, actúa como precursor de mensajeros lipídicos denominados eicosanoides (ácidos grasos de 20 carbonos), los cuales participan en múltiples procesos fisiológicos y patológicos (Nie et al., 2002).

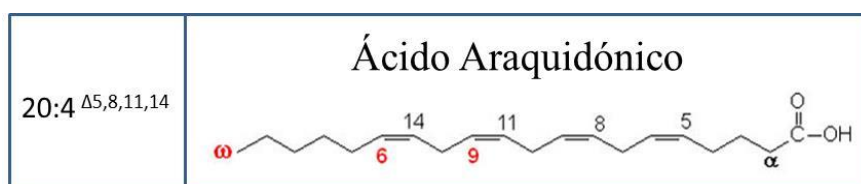


Figura 2. Estructura química del ácido araquidónico. Ácido graso de 20 carbonos con 4 dobles enlaces en la posición 5, 8, 11 y 14. La denotación ω -6 implica que a partir del carbono terminal (ω), el primer doble enlace se localiza en la posición 6 (Nie et al., 2002).

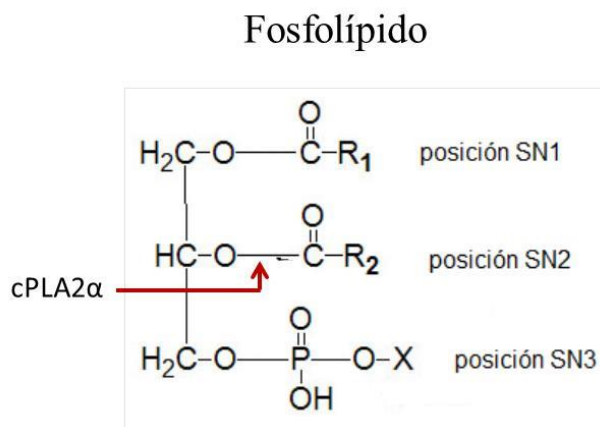


Figura 3. Estructura básica de un fosfolípido y sitio de acción de la fosfolipasa cPLA₂α. El fosfolípido está formado por un ácido graso saturado (R₁), un ácido graso insaturado (R₂, generalmente ácido araquidónico) y un grupo X que puede ser serina, etanolamina o colina. La enzima cPLA₂α escinde el ácido graso que se encuentra en la posición SN2.

2.2. Biosíntesis de Eicosanoides

En la Figura 4 se muestran las distintas rutas por medio del cual el AA da lugar a la formación de eicosanoides. Las enzimas citocromo P450 aromatasa (CYP), lipooxigenasas (LOX), y ciclooxigenasas (COX); participan en la generación de ácidos epoxieicosatrenoicos (EET), ácidos hidroxieicosatetraenoicos [HETES] y tromboxanos-prostaglandinas, respectivamente (Berquin et al., 2011).

El sistema CYP cataliza la mono-oxigenación del AA a través de tres vías: 1) oxidación tipo lipoxigenasa, la cual produce 5, 8, 9, 11, 12 y 15-HETE, 2) hidroxilación la cual genera 16, 17, 18, 19 y 20-HETEs y 3) reacción de epoxigenación la cual produce EETs. Esta vía parece ser relevante en sistemas que expresan poca o nula actividad COX y LOX (Greene et al., 2011).

Las enzimas ciclooxigenasas (COX) pertenecen a la familia de las metaloenzimas, las cuales actúan a través de mecanismos de óxido-reducción. Catalizan la di-oxigenación del AA a prostaglandina G₂ (PGG₂), posteriormente por mecanismo de peroxidación, la PGG₂ es transformada a PGH₂. Por acción de sintasas específicas, este metabolito da lugar a la formación de prostaglandinas (PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂α) y tromboxanos (TxA₂). En humanos se han identificado los genes PTGS-1 y PTGS-2, los cuales codifican para las enzimas COX-1 y COX-2, respectivamente (Lu et al., 1999). El primero se expresa de manera constitutiva, mientras que el segundo es inducido por una amplia gama de estímulos fisiológicos o patológicos. Aunque ambas isoenzimas se expresan en prácticamente todos los tejidos, COX-1 se encuentra de manera preferencial en células del sistema inmune, plaquetas y endotelio; mientras que COX-2 además de expresarse en célula inmunes, también se expresa en endotelio, fibroblastos, músculo liso y células epiteliales (colon, pulmón, próstata, etc.) (Krishnan y Feldman, 2010). En términos enzimáticos no existen diferencias cinéticas (K_m y V_{max}) entre COX-1 y COX-2 en presencia de AA como sustrato. Sin embargo, existe la evidencia que COX-2 al utilizar como sustrato precursores y/o derivados del AA tiene valores de K_m más bajos que COX-1 (Lu et al., 1999; Kozac et al., 2001; Laneuville et al., 1995). La variedad de sustratos utilizados por la enzima COX-2,

podría explicar la complejidad de efectos asociados con la cantidad y calidad de lípidos aportados por la dieta (Kuhn et al., 2014).

Por otra parte, las enzimas LOX catalizan la dio-oxigenación del AA y dan lugar a la formación de hidroperóxidos (ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos, HPETEs). A su vez, estos metabolitos son transformados por medio de reacciones de peroxidación a hidroxiácidos (ácidos hidroxiieicosatetraenóicos HETEs) y leucotrienos (LT). En humanos se han identificado 4 genes funcionales (ALOX5, ALOX12, ALOX15, y ALOX15B), los cuales codifican a las isoformas 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX-1 y 15-LOX-2. Esta nomenclatura se basa en la especificidad con la que llevan a cabo la reacción de oxigenación en determinado número de carbono (Kuhn et al., 2014).

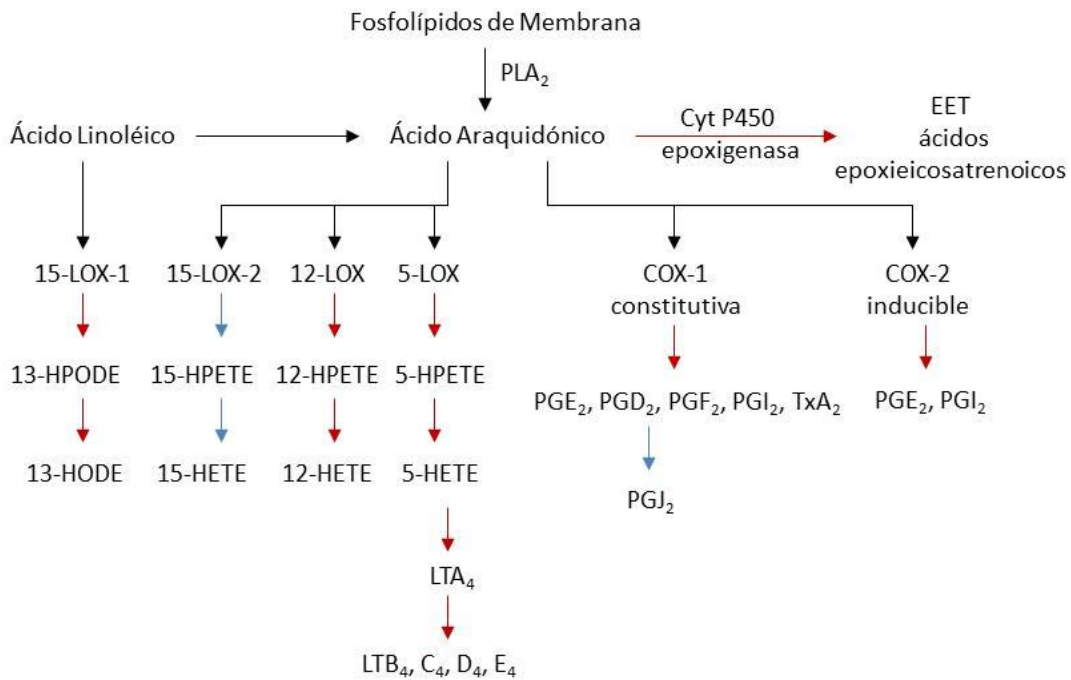


Figura 4. Vías metabólicas del ácido araquidónico. Dependiendo del contexto celular, el AA puede ser metabolizado por distintas rutas y dar lugar a la formación de lípidos con actividad biológica. Las principales enzimas involucradas en este proceso son: citocromo P450 (CYP), lipoxigenasas (LOX) y ciclooxigenasas (COX). Modificado de: Harizi H et al., 2008. Flecha azul indica metabolitos anti-inflamatorios y/o anti-tumorales. Flecha roja indica metabolitos pro-inflamatorios y/o pro-tumorales.

2.2.1. Vía lipoxigenasa

Las enzimas LOX también pertenecen a la familia de las metaloenzimas. En estas enzimas se reconocen dos dominios funcionales, uno está implicado en la regulación de la actividad enzimática (alosterismo), mientras que el otro contiene el sitio catalítico de unión al sustrato. Estas enzimas catalizan principalmente 2 reacciones, 1) la oxigenación de ácidos grasos poli-insaturados a hidroperóxidos, a través de una abstracción del hidrógeno y posterior dioxigenación; 2) la peroxidación de sus propios hidroperóxidos HPETEs a hidroxiácidos HETEs, a través de la abstracción de un radical hidroxilo (Ivanov et al., 2015). Como se muestra en la Figura 5, este proceso enzimático forma parte de un ciclo catalítico, ya que los hidroperóxidos generados inducen nuevamente la activación enzimática. Estas enzimas contienen en su sitio activo un átomo de hierro (Fe^{2+}), el cual se oxida a Fe^{3+} cuando la enzima se activa (Schnurr et al., 1996 y Lepley y Fitzpatrick, 1994). Existen evidencias que los hidroperóxidos estimulan y/o inhiben de manera alostérica (no involucra sitio activo) la actividad de LOX (Wecksler et al., 2008). Este ciclo catalítico se detiene en presencia de enzimas y/o agentes antioxidantes (Schnurr et al., 1996; Schneider et al., 2007), o ante mecanismos suicidas, los cuales involucran la inactivación del sitio activo por reacciones de óxido-reducción y/o unión covalente de hidroperóxidos (Wiesner et al., 2003).

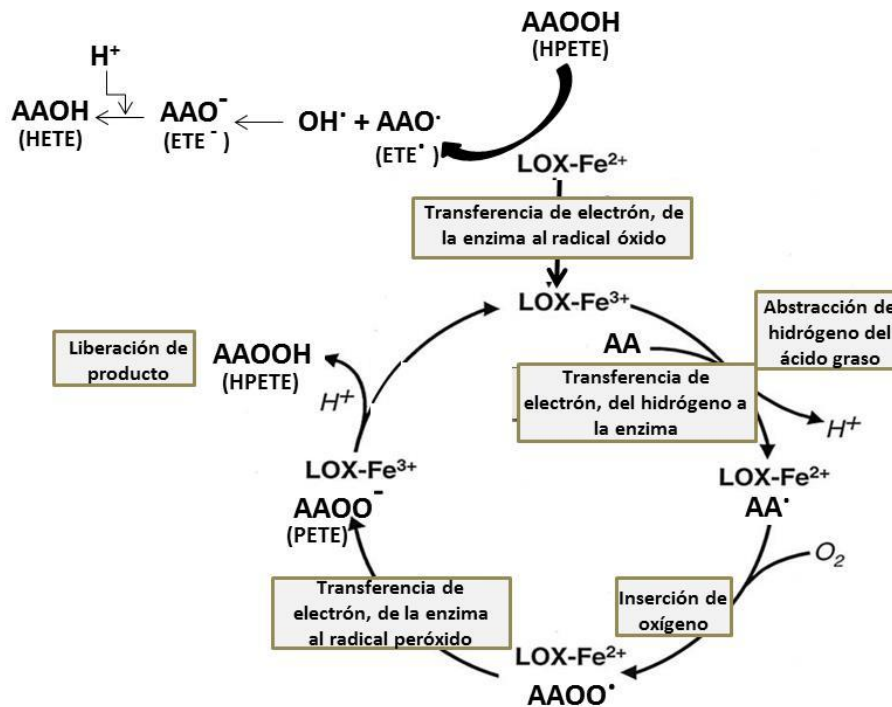


FIGURA 5. Mecanismo de acción de la lipoxigenasa. Acido araquidónico (AA). AA[°]: radical ácido araquidónico, AAO[°]: radical óxido ácido araquidónico. AAOO[°]: radical peróxido ácido araquidónico. AAOO⁻: peróxido ácido araquidónico. AAOOH: hidroperóxido ácido araquidónico. Nota. Además del AA, la enzima LOX puede utilizar otros ácidos grasos insaturados como sustrato. Modificado de Kuhn y Borchert, 2002.

2.2.2. Isoformas de lipoxigenasa

Se ha reportado que existen al menos 4 isoformas de las enzimas LOX. La 5-, 12-, 15-LOX-1 y 15-LOX-2, las cuales se expresan primordialmente en leucocitos, plaquetas y endotelio, pero también en algunos tipos de epitelios normales y tumorales. Las isoformas 5-, 12- y 15-LOX-2 utilizan preferentemente AA como sustrato, mientras que 15-LOX-1 utiliza ácido linoléico. Como ya se mencionó, estas enzimas llevan a cabo reacciones duales de oxigenación y peroxidación.

La enzima 5-LOX participa en la generación del hidroperóxido 5-HPETE, precursor del 5-HETE y de una amplia gama de leucotrienos (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄) (Figura 4). Se localiza abundantemente en células sanguíneas (granulocitos, macrófagos, células B,

células cebadas) y se ha propuesto que los leucotrienos participan en la respuesta inflamatoria, a través de mediar la quimiotaxis de los neutrófilos, la permeabilidad vascular y la formación de edema. 5-LOX también se expresa en una amplia variedad de epitelios cancerosos; incluyendo la próstata, y se ha propuesto que sus metabolitos además de mediar inflamación, estimulan la proliferación celular y activan vías angiogénicas y de supervivencia celular (Ding et al., 2003). La expresión de esta enzima es estimulada por factores de transcripción como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Vendramini y Carvalho, 2012).

La enzima 12-LOX contribuye en la generación del hidroperóxido 12-HPETE, precursor del 12-hidroxicicosatetraenoico (12-HETE). Se expresa en leucocitos, plaquetas y queratinocitos. Su principal función es estimular la quimiotaxis en piel (Ruzicka, 1992). En tejidos tumorales se ha encontrado su expresión en la próstata promoviendo procesos angiogénicos (Jankun et al., 2006). En la región promotora de este gen se han descrito secuencias consenso del factor de transcripción humano (SP1), elementos AP2 y sitio de unión NFkB (Ruzicka, 1992).

La enzima 15-LOX-1 produce la formación de 13-HPODE, precursor de 13-HODE (13-hidroxiocicadecadienoico). 15-LOX-1 presenta una afinidad cuatro veces mayor por ácido linoléico (Kd, 3µM) en comparación con AA (Kd, 12µM), generando el 13-HODE con el primero y 15-HETE con el segundo. El 13-HODE y 15-HETE presentan actividades pro- y anti-tumorales respectivamente (Kuhn et al., 2014; Wecksler et al., 2008). 15-LOX-1 se encuentra en los reticulocitos y participa en la diferenciación de eritrocitos maduros. Pero también participa en procesos patológicos (arterosclerosis, inflamación y cáncer). Se conoce que la interleucina-4 y 13 inducen la expresión de esta enzima a través de la activación de las proteínas Jak 2, tirosin cinasas Tyk2 y Stats 1, 3, 5 y 6. En el promotor del gen se encuentran elementos de respuesta SP1 y AP2 (Kritzik et al., 1997).

El papel de la enzima 15-LOX-2 es generar el hidroperóxido 15-HPETE, precursor del ácido 15-hidroxicicosatetraenoico (15-HETE). Esta enzima se expresa en algunos epitelios como la piel, próstata, pulmón y córnea. El 15-HETE induce diferenciación y apoptosis

celular (Shappell et al., 2001). Su expresión está regulada positivamente por SP1 y negativamente por SP3 y en el promotor del gen tiene elementos de respuesta a receptores nucleares de estrógenos y a receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) (Tang et al., 2002 y Subbarayan et al., 2006).

2.2.3. Mecanismo de acción de los HETEs y leucotrienos

Se conoce que los HETEs además de participar como precursores de leucotrienos, también ejercen efectos activando diferentes vías de señalización. El 15-HETE actúa como ligando de PPAR γ , mientras que el resto de HETES, activan la vía del receptor nuclear PPAR α , o bien canales catiónicos como los TRPV-1 (receptor de potencial transitorio). Por otra parte, los leucotrienos de la familia B (LTB $_4$) se unen a receptores de membrana (BLT-1 y 2) acoplados a proteínas Gi (inhibidora de adenilato ciclasa) que desencadena la activación de NFkB vía JAK/STAT. Mientras que los LTC $_4$, LTD $_4$ y LTE $_4$ se unen al receptor leucotrieno-cisteína (CYSLT-1 y 2) el cual está acoplado a proteínas Gq (activadora de fosfolipasa C/IP3/Ca $^{2+}$) (Dennis y Norris, 2015).

2.3. Ácido araquidónico y vía lipoxigenasa en el cáncer de próstata

Diversos estudios apoyan la noción de que los metabolitos del AA participan activamente en la iniciación y progresión del cáncer prostático (Patel et al., 2008). Tanto en líneas celulares humanas, como en tumores prostáticos, se ha reportado un aumento en la velocidad de recambio del AA, lo cual se refleja en una mayor expresión y actividad de las enzimas involucradas en la generación de lípidos bioactivos (Yang et al., 2012, Ghosh y Myers 1997). En el Cuadro 1 se resumen algunos de los principales efectos de los HETEs en el cáncer prostático y sus vías de señalización.

Cuadro 1. Participación de la vía lipoxigenasa en el cáncer prostático

Enzima	Sustrato	Metabolito	Efecto	Vía de Señalización	Ref.
5-LOX	AA	5-HETE	Proliferación	Activa PKCε	(1) y (2)
12-LOX	AA	12-HETE	Angiogénesis	Activa VEGF. Activa NFκB.	(3) y (4)
15-LOX-1	LA	13-HODE	Proliferación Angiogénesis	Activa MAPk. Activa IGF-1 y VEGF	(5)
15-LOX-2	AA	15-HETE	Arresto celular Apoptosis	Activa PPARγ. Inhibe MAPk.	(5) y (6)
5-LOX	5-HETE	LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄	Inflamación	Activa NFκB	(7)

(1) Sarveswaran et al., 2011. (2) Ghosh y Myers, 1998. (3) McCabe et al., 2006. (4) Kandouz et al., 2003. (5) Hsi et al., 2002. (6) Shappell et al., 2001. (7) Dennis y Norris, 2015.

Se ha demostrado que los niveles de los metabolitos 5, 12 y 15-LOX-1 aumentan conforme el tumor prostático progresa y su presencia está asociada a procesos de invasión y metástasis, mientras que los niveles de los metabolitos de la enzima 15-LOX-2 están disminuídos y su presencia induce anti-proliferación (Shappell et al., 2001 y Hsi et al., 2002).

2.4. PPAR en el cáncer de próstata

2.4.1. Generalidades de PPAR

Los PPAR pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y actúan como factores de transcripción activados por ligando, y regulan genes involucrados en la diferenciación celular y en procesos metabólicos, especialmente homeostasis lipídica y de glucosa. Son codificados por distintos genes en diferentes cromosomas y dan lugar a diferentes isoformas PPARα, PPARβ/δ y PPARγ. Las isoformas α y γ se encuentran principalmente expresados en el tejido adiposo, hígado, riñón, músculo esquelético, y algunos epitelios, mientras que la isoforma β/δ tiene una expresión ubicua. Los ácidos grasos libres

insaturados, como el AA y sus derivados actúan como ligandos de los receptores a PPAR (Cuadro 2) (Grygiel 2014).

Cuadro 2. Ligandos naturales y sintéticos de los PPAR

Ligandos naturales y sintéticos de los PPARα, PPARβ/δ y PPARγ		
PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ
Naturales		
Ácidos grasos ω -3, ω -6	Ácidos grasos ω -3, ω -6	Ácidos grasos ω -3, ω -6
LTB ₄	Prostaciclina	15-PGJ2
8-HETE	γ ALA	9 y 13-HODE
		15-HETE
		6-yodolactona *
Sintéticos		
Fibratos	GW501516	Tiazolidinedionas
		NSAIDS

* En tejido tiroideo y mamario (Dugrillon et al., 1994 y Aceves et al., 2009). Modificado de Grygiel, 2014 y Lehman et al., 1997.

2.4.1.1 Activación de PPAR

La interacción del receptor con su ligando, promueve la formación de un heterodímero con otro receptor nuclear (receptor a retinoides RXR) y se trasloca a núcleo. El heterodímero se une a elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE) en el DNA, de la región promotora del gen blanco. Los ligandos que activan a PPAR-RXR, causan una disociación de complejos correpresores (NCoR/SMART) y una asociación con complejos coactivadores (SRC-1, TIF2/GRIP1 y CBP), regulando así la transcripción génica (Di Renzo et al., 1997 y Daynes y Jonnes, 2002) (Figura 6).

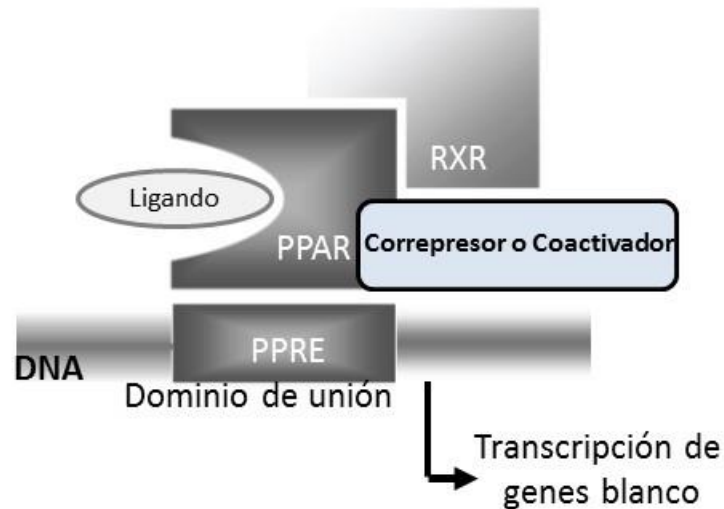


Figura 6. Mecanismo de transcripción génica de PPAR. PPAR unido a su ligando forma un heterodímero con RXR y se trasloca a núcleo, donde se disocia de correpresores y se asocia con coactivadores. Modificado de Grygiel 2014.

2.4.1.2. Mecanismos de transrepresión mediados por PPAR.

Se han reportado otros mecanismos a través de los cuales el complejo PPAR-RXR regula negativamente la actividad de factores de transcripción. a) El complejo puede interactuar y “secuestrar” coactivadores que otros factores de transcripción requieren para su función (Li et al., 2000). b) El complejo puede directamente interactuar (proteína-proteína) con los factores de transcripción como AP-1, NFkB o STATs, inhibiendo así su actividad (Delerive et al., 1999). c) El complejo puede interactuar con cinasas e inhibir la fosforilación y activación de ciertos miembros de la vía de MAPK (c-Jun y p38) (Desreumaux et al., 2001) (Figura 7).

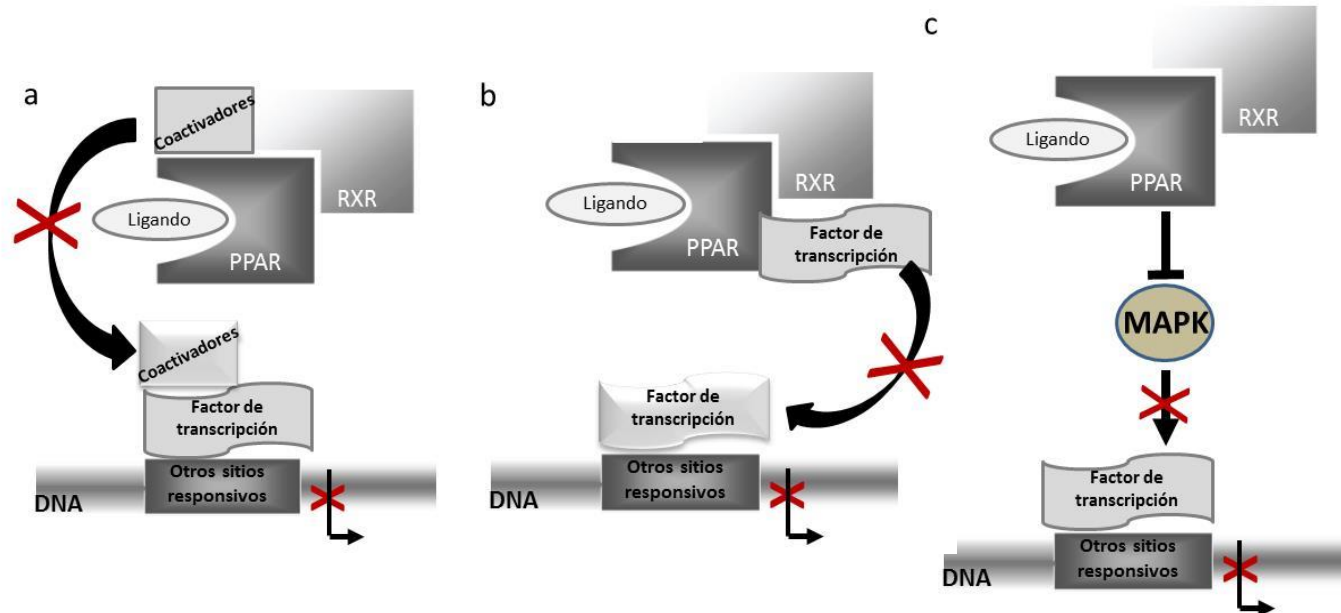


Figura 7. Mecanismos de transrepresión mediado por PPAR. a) Los receptores PPAR compiten por proteínas coactivadoras que quedan indisponibles para otros factores de transcripción. b) Los PPAR se asocian físicamente con otros factores de transcripción, evitando que éstos se unan a sus elementos de respuesta en DNA. c) Los PPAR inhiben la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), evitando la activación de diversos factores de transcripción. Modificado de Daynes y Jonnes 2002.

2.4.1.3. Ligandos de PPAR y efectos independientes a la activación de PPAR

Es bien conocido que la 15-PGJ2 así como algunos ligandos sintéticos, inhiben la producción de citocinas inflamatorias (TNF α , INF γ , IL-1, IL-6), la generación de óxido nítrico (NO) y la expresión de metaloproteasas (MMP-9). Parte de estos efectos anti-inflamatorios han sido explicados a través de inhibir la vía de NF κ B, por un mecanismo que no involucra la activación de PPAR. Estudios en macrófagos han mostrado que la 15-PGJ2 inhibe la actividad de la cinasa IKK y por la tanto la fosforilación de I κ B, paso crucial en la activación de NF κ B (Delerive et al., 2001 y Castrillo et al., 2000).

2.4.2. Cáncer de próstata

En cáncer, los PPAR se expresan en diversos tejidos como próstata, pulmón, mama, colon, duodeno, tiroides y vejiga (McKenna y O'Malley, 2002, Yu y Reddy, 2007). En comparación con la próstata normal, en el cáncer prostático las isoformas α y γ se expresan de manera abundante, lo cual está relacionado directamente con la malignidad del tumor (Collett et al., 2000, Segawa et al., 2002). Se desconoce si el epitelio normal de próstata expresa la isoforma β , pero en el cáncer está asociada con crecimiento e invasión tumoral (Her et al., 2013). A diferencia de PPAR α y PPAR β/δ , los ligandos a PPAR γ se han propuesto como potentes agentes antitumorales (Nagata et al., 2008). El 15-HETE activa a los receptores PPAR γ durante la inflamación y el cáncer, así como los ligandos sintéticos a PPAR γ (troglitazonas), que reducen la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata, a través de la inactivación de NF κ B vía supresión de la expresión de enzimas cinasas serina/treonina (GSK-3 β) (Ban et al., 2011). Existen evidencias que el 13-HODE, puede actuar como ligando de PPAR γ , sin embargo esto no ha sido totalmente esclarecido (Huang et al., 1999). Se conoce que en el cáncer de próstata el 13-HODE activa la vía de las MAP cinasas, las cuales inactivan (fosforilación) a los receptores PPAR γ (Hsi et al., 2002). Estudios clínicos de fase II han evaluado el uso de troglitazona local (800mg/día) en pacientes con cáncer de próstata dependiente e independiente de andrógenos, encontrando en el primer grupo una reducción del 50% en los niveles del antígeno prostático (PSA) en el grupo andrógeno-dependiente, mientras que en el segundo lo redujo en menos de un 40% (Hatton y Yee, 2008). La resistencia de este último grupo, la han relacionado con mutaciones del gen (Mueller et al., 2000). En términos terapéuticos, se ha propuesto evaluar terapias combinatorias, las cuales incluyen el uso de agonistas PPAR gamma, inhibidores de LOX y antagonistas de LTB $_4$, sin embargo, aún no se tienen estudios concluyentes (Baetz et al., 2007 y Friedlander et al., 2012).

2.5. Yodolípidos y cáncer

En la década de los 50' se identificaron por primera vez lípidos yodados en la glándula tiroides y se propuso que éstos compuestos podrían mediar algunos de los efectos del yodo

en la tiroides. Es bien conocido que un exceso de yodo inhibe varios procesos tiroideos asociados a la síntesis de hormonas tiroideas (efecto Wolf-Chaikoff), por ejemplo disminuye la generación de AMPc en respuesta a TSH, la organificación del yodo, proteólisis de la tiroglobulina, secreción hormonal, flujo sanguíneo, crecimiento tiroideo, etc., sin embargo, estos efectos son transitorios, ya que en el transcurso de una semana éstos se restablecen (Dugrillon, 1994).

Existen evidencias en tiroides y glándula mamaria, que el AA en presencia de yodo, puede ser convertido a lactonas (6-yodolactona [5-hidroxi-6-yodo-8,11,14-eicosatrienoico delta lactona]) o aldehídos (α -yodohexadecanal) (Nava-Villalva y Aceves, 2014). En modelos animales con cáncer mamario, la suplementación con yodo molecular (I_2), pero no con yoduro (I^-), disminuye la incidencia tumoral y retrasa la latencia de los tumores. El I_2 reduce la proliferación celular e induce apoptosis en líneas celulares y tumores de cáncer mamario (García-Solis et al., 2005; Arroyo-Helguera et al., 2006). Se ha reportado que la inducción de apoptosis ocurre a través de vías mitocondriales dependientes e independientes de caspasas (Bax/ factor inductor de apoptosis respectivamente) (Shrivastava et al., 2006; Arroyo-Helguera et al., 2008). El I_2 también previene la sobreexpresión de genes relacionados con invasión celular como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) (Mendieta et al., 2012). Por otra parte se ha reportado que el I_2 reduce la formación de aductos mediada por estrógenos (Soriano et al., 2011). En conjunto los efectos antineoplásicos del yodo, se explican a través de los siguientes mecanismos: 1) capacidad pro y/o anti oxidante, 2) inhibición del efecto estrogénico sobre la formación de aductos y 3) generación de un lípido activo (6-IL) a partir de la yodación del AA, el cual actúa como ligando de los receptores nucleares a PPAR γ (Nuñez-Anita et al., 2009). Por otra parte se ha mostrado que los efectos antiproliferativos del I_2 y de la 6-IL, también se observan en líneas tumorales de neuroblastoma, pulmón y tiroides (Rosner et al., 2010; Gartner et al., 2010). En términos generales se ha mostrado que las células no cancerosas son menos sensibles a los efectos del I_2 y de la 6-IL, que las células cancerosas (Shrivastava et al 2006; Arroyo-Helguera et al., 2006; Rosner et al., 2010). Se ha propuesto que los niveles elevados de AA presentes en las células cancerosas podrían favorecer la formación de 6-IL (Aceves et al., 2013).

2.5.1. Patologías prostáticas

Estudios de nuestro grupo han mostrado que el epitelio prostático normal, hiperplásico y tumoral; captan yodo (Aceves y Anguiano, 2009; Olvera et al., 2013; Aranda et al., 2013). En un modelo animal de hiperplasia se mostró que la administración de I^- o I_2 en el agua para beber, impide la hiperplasia epitelial asociada a la administración de hormonas sexuales (Aceves y Anguiano, 2009). Este modelo genera estrés oxidativo, y se ha reportado que el I_2 previene el aumento en la peroxidación de lípidos, y reduce significativamente los niveles de nitritos, así como los niveles de prostaglandinas y leucotrienos (Quintero et al., 2014). En células de cáncer prostático y en tumores generados por xenotransplantes (ratones atímicos inoculados con células LNCaP), se ha mostrado que ambas formas químicas de yodo reducen la proliferación celular e inducen apoptosis a través de la vía Bax/caspasas (Aranda et al., 2013). Los mecanismos se desconocen pero se ha propuesto que la generación de 6-IL y la activación de los PPAR γ , podrían estar involucrados en esta respuesta (Nuñez-Anita et al., 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la glándula tiroides hiperplásica como en varios tipos de cáncer (mamario, neuroblastoma, pulmón), se ha encontrado que existe una relación directa entre la ingesta de yodo y la formación de lípidos yodados (aldehídos y lactonas). Estos yodolípidos se producen a partir de la yodación del AA y se ha reportado que la 6-IL ejerce efectos antiproliferativos y apoptóticos en células cancerosas capaces de captar yodo. Estudios de nuestro grupo muestran que la 6-IL podría actuar como ligando de los receptores nucleares a PPAR γ , y que este podría ser uno de los mecanismos a través del cual el yodolípido, induce la expresión de genes relacionados con diferenciación, arresto del ciclo celular, y/o apoptosis. La próstata tumoral expresa niveles elevados de PPAR γ y aunque se desconoce su relevancia funcional en la tumorigénesis, estudios clínicos muestran que la administración de agonistas específicos a PPAR γ reducen los niveles de PSA. Por otra parte, se ha mostrado que el epitelio prostático hiperplásico y/o canceroso capta yodo, lo cual reduce la proliferación, estrés oxidativo e induce apoptosis. El propósito de esta tesis fue evaluar en una línea celular prostática humana de origen no canceroso (RWPE-1) y canceroso (LNCaP), los efectos de la 6-IL exógena en la proliferación y apoptosis, así como la participación de los PPAR γ y de las lipoxigenasas en estos procesos. Se analizó la expresión (mRNA) de PPAR γ y 15-LOX-1, así como los efectos directos de 6-IL sobre la actividad de 15-LOX-1.

4. HIPÓTESIS

La 6-IL ejercerá efectos antitumorales a través de activar los PPAR γ y/o inhibir la expresión y/o actividad de 15-LOX-1.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar los mecanismos antitumorales de la 6-IL en un modelo *in vitro* de cáncer prostático humano.

5.1. Objetivos Específicos

1. Analizar los efectos de la 6-IL en la viabilidad celular y apoptosis, en líneas celulares humanas prostáticas de origen no tumoral (RWPE-1) y tumoral (LNCaP).
2. Evaluar si los efectos de la 6-IL están mediados por PPAR γ y/o lipoxigenasas.
3. Analizar los efectos de la 6-IL sobre la expresión de PPAR γ y 15-LOX-1.
4. Analizar los efectos directos de la 6-IL sobre la actividad de 15-LOX-1.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Materiales y Reactivos

Las líneas celulares se adquirieron de la ATCC (del inglés. *American Type Culture Collection*, Manassas VA, EE UU). Los medios de cultivo, el suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*), el extracto hipofisiario bovino (BPE, del inglés *bovine pituitary extract*), el factor de crecimiento epidermal (EGF, del inglés *epidermal growth factor*), los antibióticos, así como todos los reactivos utilizados para la extracción del RNA y RT-PCR fueron adquiridos de Invitrogen (Carlsbad CA, EE UU). El estuche comercial para detectar la apoptosis por fluorescencia, fue obtenido de Agilent Cell Assay (Santa Clara CA, EE UU). El ácido araquidónico, la enzima lipoxigenasa de soya en su forma pura (646 U/ μ g), el antagonista a PPAR γ (GW9662), el inhibidor de lipoxigenasa (ácido nordihidroguayarático NDGA), así como todos los reactivos utilizados en la síntesis de 6-IL fueron adquiridos de Sigma (St Louis MO USA). El ensayo para medir la formación de peróxidos se obtuvo de Thermo Scientific (Rockford Illinois, EE UU).

6.2. Líneas Celulares

Se utilizaron líneas celulares humanas, representativas de un epitelio prostático no canceroso (RWPE-1) y canceroso (LNCaP). La línea RWPE-1 proviene de la zona periférica prostática de una región histológicamente normal y la LNCaP proviene de una metástasis a nódulo linfático. Las células RWPE-1 se crecieron en medio de cultivo de keratinocitos libre de suero bovino fetal, suplementado con extracto de glándula pituitaria bovina (0.05 mg/ml) y factor de crecimiento epidermal (5 ng/ml). Las células LNCaP se

crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10 %). Ambas líneas celulares se crecieron a 37°C, en presencia de penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), en una incubadora con humidificador de CO₂.

6.3. Diseño Experimental

6.3.1. Efecto de la 6-yodolactona en la viabilidad celular

Las células RWPE-1 y LNCaP fueron tratadas con diferentes concentraciones de 6-IL (0.5, 1, 5, 10, 50, 100 y 250 µM), durante 24, 48, 72 y 96 horas. El grupo control fue incubado con vehículo (etanol < 0.2 %). La viabilidad se evaluó con el método de exclusión con azul tripano. La media de la concentración máxima inhibidora (IC₅₀) se calculó a partir de la función sigmoidea $y = [D + (A - D)] / [1 + 10^{((x - \log IC_{50}) / B)}]$, donde y representa el porcentaje de inhibición celular, D: el número de células iniciales, A: el número de células a las 96 horas, x: el logaritmo de la concentración de 6-IL y B: el factor de ajuste a la curva.

6.3.2. Efectos del I₂ y de la 6-yodolactona sobre la viabilidad celular. Participación de PPAR gamma y de las lipoxigenasas.

Las células RWPE-1 y LNCaP fueron pre-incubadas durante 12 horas con el GW9662, antagonista específico para PPAR γ (0.05 µM). Se realizó una curva dosis respuesta en la que se analizó el efecto de diferentes concentraciones de GW9662 (0.01 - 2 µM), sobre la viabilidad celular. La concentración que no modificó la viabilidad fue de 0.05 µM. Posteriormente, ambos tipos celulares fueron co-incubados con I₂ (200 µM) y/o GW9662 (0.05 µM) y/o NDGA (5 µM) o 6-IL (5 o 50 µM) y/o GW9662 (0.05 µM) y/o NDGA (50 µM), por 96 horas. El grupo control fue incubado con vehículo (etanol < 0.2 %). El GW9662 antagoniza de manera irreversible a los receptores PPAR γ , modificando covalentemente un residuo de cisteína en el dominio de unión a ligando (inhibición competitiva), presenta una IC₅₀ en el orden nM. Su unión a PPAR γ en comparación con los receptores PPAR α y PPAR β/δ es de 10 y 600 veces más alta, respectivamente (Leesnitzer et al., 2002). El NDGA es un inhibidor de lipoxigenasas, el cual se une covalentemente al sitio activo de estas enzimas, (inhibición competitiva) presenta un IC₅₀ en el orden µM (Youngren et al., 2005).

6.3.3. Efectos de la 6-yodolactona en la apoptosis

Las líneas celulares fueron tratadas con 6-IL (1, 5 o 10, 50 μ M) durante 72 horas. El grupo control se incubó con vehículo (etanol < 0.2 %). La apoptosis temprana se evaluó mediante la detección de anexina V (método fluorescente).

6.3.4. Efectos de la 6-yodolactona sobre la expresión génica

Las líneas celulares fueron tratadas durante 24 horas con 5 o 50 μ M de 6-IL. El grupo control recibió el vehículo (etanol < 0.2 %). La expresión de PPAR γ y 15-LOX-1 se analizó por RT-PCR (tiempo real).

6.3.5. Efecto de la 6-yodolactona sobre la actividad de 15-Lipoxigenasa-1

El propósito de este experimento fue analizar el efecto directo de la 6-IL sobre la actividad de la enzima 15-LOX-1, utilizando AA como sustrato. En este experimento se utilizó la lipoxigenasa de soya como un equivalente a la 15-LOX-1 humana. Se analizó el curso temporal de 15-LOX-1 (15 - 150 minutos), en ausencia y presencia de 6-IL. Como control negativo se utilizó NDGA. Se definió el tiempo óptimo de incubación y después se analizó la actividad de 15-LOX-1 con diferentes concentraciones de AA (10, 25, 50, 100 y 200 μ M), en ausencia o presencia de 6-IL (50 μ M). Todas las incubaciones se realizaron a 37°C a pH 7.0. A partir de estos datos se calcularon los parámetros cinéticos de la enzima, velocidad máxima de reacción y afinidad enzima / sustrato (V_{max} y K_m) mediante la ecuación de Michaelis-Menten $v = (V_{max} (S) / K_m + S)$. La actividad de 15-LOX 1 se evaluó a través de un método colorimétrico indirecto, el cual mide la generación de peróxidos como producto (PeroXOquant). La actividad de la LOX-1 de soya es equivalente a 15-LOX-1 humana y es ampliamente utilizada en estudios cinéticos (Wecksler et al., 2008).

6.4. Métodos Analíticos

6.4.1. Síntesis de la 6-yodolactona

La síntesis *in vitro* de 6-IL se llevó a cabo con una modificación al método de Monteagudo et al. (1990). La reacción se llevó a cabo a partir de AA (3.0 μM) y yodo molecular (8.0 μM). La mezcla se incubó 4 horas (4°C), en una atmósfera de nitrógeno, protegida de la luz. El producto de reacción se separó a través de una cromatografía en capa fina, con un sistema de diclorometano: metanol (97.5: 2.5 v/v). La identidad del lípido se corroboró en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrofotometría de masas (Dra. Mercedes López CINVESTAV-Irapuato). En el apéndice de esta tesis (sección 12.1) se muestra una propuesta del modelo de síntesis química de la 6-yodolactona en ambiente acuoso. Esta propuesta la realicé con la supervisión del Ing. Bioquímico Carlos Gerardo Zavala Porto. Docente de Química Orgánica de la Facultad de Química, UAQ.

6.4.2. Viabilidad Celular

La viabilidad celular se evaluó a través del método de exclusión con azul de tripano (Tennant et al., 1964). Las células se resuspenden en 1.0 ml de medio de cultivo, del cual se toma una alícuota de 10 μl y se mezcla en una relación 2:1 con azul de tripano. Las células totales y teñidas se cuentan en un hematócmetro. El azul de tripano es un marcador de células muertas, por lo que el número de células viables se calculó de la diferencia del número total de células, menos el número de muertas. Los resultados se reportan como número de células vivas por unidad de tiempo.

6.4.3. Análisis de la Apoptosis

La apoptosis se evaluó por fluorescencia, mediante el análisis del cociente anexina V/calceína. El método se basa en la detección de anexina-fosfatidilserina como marcador de apoptosis temprana. La fosfatidilserina se trasloca al exterior de la membrana plasmática durante el proceso apoptótico. La fosfatidilserina es un fosfolípido de membrana que se trasloca hacia la membrana externa durante la apoptosis temprana. La calceína es un fluoróforo que ingresa a las células vivas. Las células se resuspenden en 200 μl de buffer a

una densidad de 20×10^4 / μl . Se incuban durante 10 minutos, a temperatura ambiente con 1.0 μl del complejo anexina-biotina (0.5 $\mu\text{g/ml}$). La mezcla se centrifuga (2500 x g, 3 minutos) y se aspira el sobrenadante. El botón se resuspende en 100 μl de buffer y se adiciona 1.0 μl de calceína (1.25 μM) y 1.0 μl de estreptavidina-fluorolink (250 $\mu\text{g/ml}$). La incubación se lleva a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. La mezcla de reacción se centrifuga (2500 x g, 3 minutos), se aspira el sobrenadante y el botón se resuspende en 100 μl de buffer. Se toma una alícuota de 10 μl y se deposita en un Cell Chip. La señal fluorescente anexina/calceína se detecta con un bioanalizador (Agilent 2100). Los resultados se expresan como porcentaje de apoptosis (%) en función del grupo no tratado.

6.4.4. RT-PCR (tiempo real)

La extracción del RNA se realizó a partir de TRIzol® y cloroformo. Se colectó la fase acuosa (sobrenadante) y se adicionó isopropanol para precipitar el RNA. El botón se resuspendió en agua estéril y se almacenó a -20°C . El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro a 260nm. La pureza se determinó mediante el cociente 260/280 nm. Las muestras presentaron un cociente promedio de 2.0. La integridad del RNA se corroboró mediante una electroforesis en geles de agarosa (1%). La retrotranscripción (RT) se realizó a partir de 2 μg del RNA total y 10 pmoles de oligo d(T), cuya mezcla se incubó a 45°C , durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó 0.5 μl de desoxinucleótidos (10 mM), 1.0 μl transcriptasa reversa (40 U), 2.0 μl DTT (0.1 M), buffer (Tris-HCL, pH 7.5). El volumen final de la reacción fue de 20 μl y se incubó 1.0 hora a 42°C , seguido de 20 minutos a 55°C . La amplificación del cDNA se llevó a cabo por PCR en tiempo real. El RT (1.0 μ) se incubó con 2.0 μl de los oligonucleótidos correspondientes (10 pmol), 10 μl de SYBER Green (Taq DNA polimerasa (60 U/ml) Tris HCL (40 mM), KCL (100 mM) MgCl₂ (6mM), dNTP's (400 μM) y UDG (40U/ml) y 1.0 μl ROX (1 μM). En el Cuadro 3 se muestran las características de los oligonucleótidos utilizados. Las condiciones de la PCR fueron: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60-63.5 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, con una alineación final de 72°C durante 5 minutos. En la fase de amplificación el valor de CT corresponde a la fluorescencia emitida por arriba del

valor umbral y es este valor el que es interpolado en una curva estándar (10^3 a 10^7 copias). Los resultados se reportan de la siguiente manera: expresión del gen de interés / expresión β -actina.

Cuadro 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para PCR

Gen	Secuencia 5 -3	Temp. de Alineación (C)	Tamaño (pb)	GenBank	Referencia
β -actina	(s) CCATCAATGAAGTGTGACGTTG (as) ACAGAGTACTTGCCTCAGGA	55	185	NM001101	Anguiano B, et.al. 2007 Thyroid. 17:851-859
15-LOX-1	(s) GGGCAAGGAGACAGAACTCAA (as) GCACAGAGATCCAGTTGCAGAA	64.5	122	NM001140.3	Mao J, et.al. 2010 Cancer Prev Res. 3:1132-1140
15-LOX-2	(s) TCGCCTCCCAGTTCCTGAA (as) AGTGACGGGGAAGTTCCTTGG	63.5	80	NM001039130 -1	
PPAR γ	(s) TCTCTCCGTAATGGAAGACC (as) GCATTATGAGACATCCCCAC	62	474	NM_138712.3	Terashita Y, et.al. 2002 Jpn J Clin Oncol. 32:238-243

6.4.5. Ensayo enzimático de 15-Lipoxigenasa-1

La actividad se determinó por medio de un ensayo colorimétrico, en el cual se mide la formación de peróxidos. El producto formado por acción de la 15-LOX-1, actúa sobre un sustrato el cual contiene un ión ferroso (Fe^{+2}) que es oxidado a férrico (Fe^{+3}). Esta reacción emite una señal de color, la cual se detecta a 550 nm. La reacción enzimática se llevó a cabo en presencia de AA (50 μ M), 6-IL (50 μ M), 15-LOX-1 (140 U/ 20 μ l), NDGA (50 μ M) y el sustrato cromogénico (100 μ M, orange xilenol). La mezcla se incubó durante 150 minutos a 37°C, en un volumen final de 200 μ l (pH 7.0). Para el ensayo de competencia (AA vs 6-IL) la incubación fue de 45 minutos (reacción exponencial, no de saturación).

6.5. Análisis Estadístico

Los datos representan el promedio de al menos tres experimentos independientes por duplicado. Se expresan como la media \pm desviación estándar (DE). Las diferencias entre grupos se determinaron con un análisis de varianza de una vía, dos vías (ANOVA) y la prueba pos-hoc Tukey ($p < 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1. Síntesis de 6-yodolactona

La Figura 8 muestra una imagen representativa de una cromatografía en capa fina. En la izquierda se observa el estándar de AA y de 6-IL. La 6-IL fue sintetizada en el laboratorio y su identidad fue corroborada en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrofotometría de masas. Los estándares de AA y 6-IL presentaron un factor de retención de 0.62 y 0.82, respectivamente. A la derecha se muestra el corrimiento de una muestra lipídica, cuyo factor de retención fue de 0.82, semejante al del estándar de 6-IL. Los lípidos fueron extraídos con diclorometano de la sílica gel. Las muestras se evaporaron con N₂ y se deshidrataron en un concentrador. El sedimento se suspendió en etanol y se almacenó a -70°C, protegido de la luz.

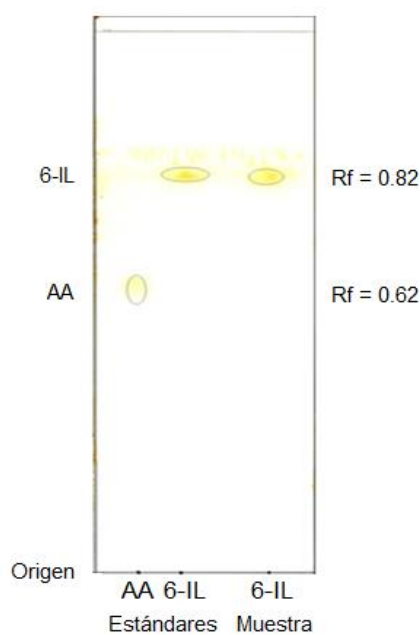


Figura 8. Imagen representativa de una cromatografía en capa fina. Los estándares de AA y 6-IL presentaron un factor de retención de 0.62 y 0.82, respectivamente. Cada vez que se sintetizó el yodolípido, se corroboró la presencia de la 6-IL en la muestra de trabajo.

7.2. Curso temporal de la 6-yodolactona en la viabilidad celular

En la Figura 9 se muestran los efectos de la 6-IL en la viabilidad de las células RWPE-1 y LNCaP. En ambos tipos celulares, se encontró una disminución significativa de la viabilidad celular. Con las concentraciones más altas se observó una reducción a partir de las 24 hrs en las RWPE-1, mientras que en las LNCaP a partir de las 72 hrs.

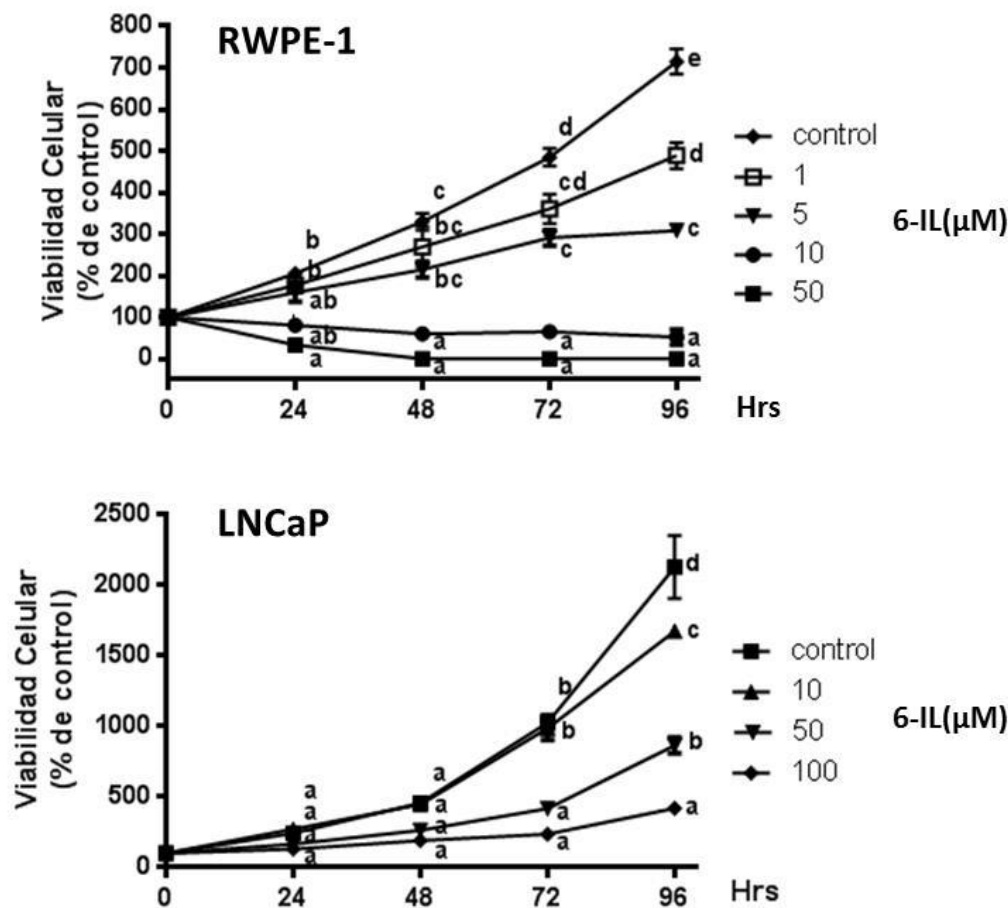


Figura 9. Curso temporal del efecto de la 6-yodolactona en la viabilidad celular. Las células fueron tratadas con 6-IL durante 24, 48, 72 y 96 horas. El número de células viables en cada tiempo fue normalizado respecto al número inicial de células (100%). Los datos representan la $X \pm DE$. Para cada línea celular se utilizó un análisis de varianza de dos vías (factor tiempo vs tratamiento) y la prueba pos-hoc de Tukey. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 3$ ensayos independientes por duplicado.

7.3. Cálculo de la concentración media máxima inhibitoria (IC₅₀) de 6-yodolactona

En la Figura 10 se muestra la viabilidad celular a las 96 horas de tratamiento. En las RWPE-1, se requirió una concentración de 1.5 μM de 6-IL para reducir el número de células viables en un 50%. En contraste, las células LNCaP fueron 13 veces menos sensibles que las RWPE-1, presentando un IC₅₀ de 20 μM .

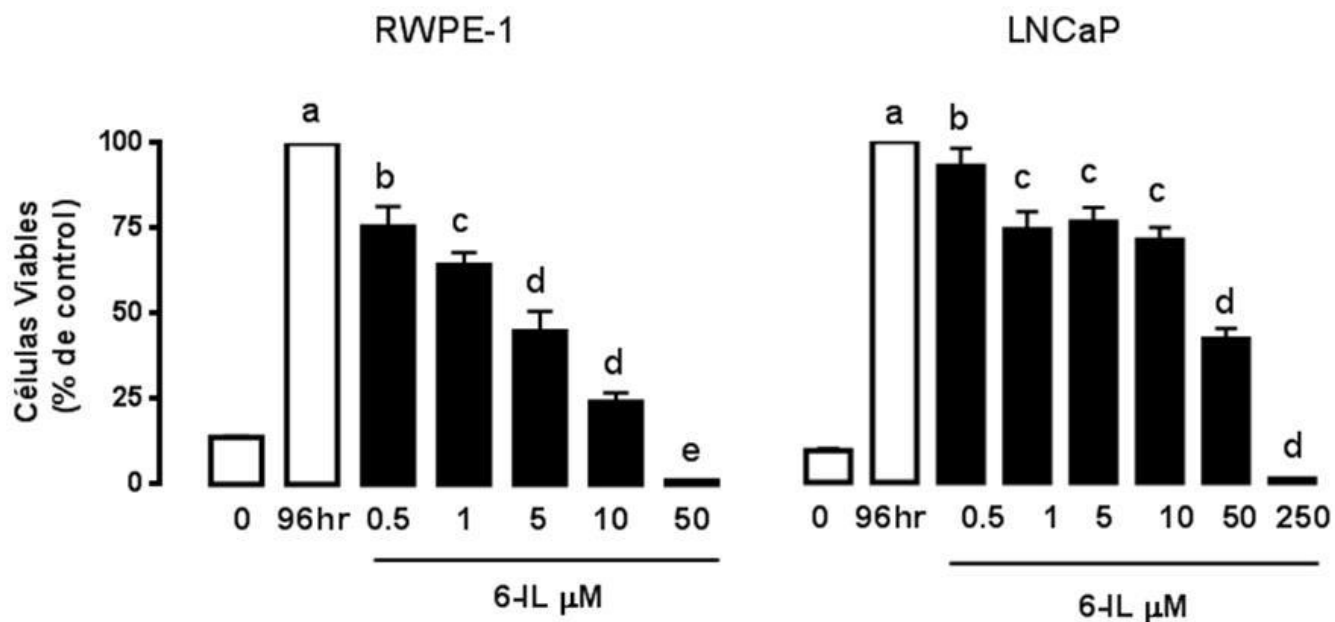


Figura 10. Cálculo de la concentración media máxima inhibitoria (IC₅₀) de 6-yodolactona. Las células fueron tratadas con 6-IL durante 96 horas. La barra blanca representa el número de células viables al inicio del experimento. El número de células viables a las 96 horas de tratamiento fue normalizado respecto al grupo no tratado (100 %). Las células RWPE-1 y LNCaP presentaron un IC₅₀ para 6-IL de 1.25 y 20 μM , respectivamente. Los datos representan la $X \pm \text{DE}$. Para cada línea celular se utilizó un análisis de varianza de una vía y la prueba pos-hoc de Tukey. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 4$ ensayos independientes por duplicado.

7.4. Efectos del I₂ y de la 6-yodolactona sobre la viabilidad celular. Participación de PPAR gamma y de las lipoxigenasas

En la Figura 11 se muestra el efecto del GW9662 sobre la viabilidad de las células LNCaP. Los resultados muestran que a partir de la concentración 0.1 μ M se reduce significativamente la viabilidad celular a las 96 hrs de tratamiento, por lo tanto en estudios posteriores se utilizó una concentración de 0.05 μ M para el antagonista. En la Figura 12 se observa el efecto del I₂ y de la 6-IL en ausencia o presencia de GW9662 y NDGA. En las células RWPE-1, tanto el I₂ como la 6-IL disminuyeron la viabilidad celular (40 y 50% respectivamente), pero el tratamiento con el antagonista no revirtió estos efectos antiproliferativos. El NDGA administrado de manera única disminuyó la viabilidad celular en un 75% y estos efectos no se sumaron a los efectos antiproliferativos del I₂ y/o 6-IL. En las células LNCaP, tanto el I₂ como la 6-IL disminuyeron la viabilidad celular (30 y 50% respectivamente), y el tratamiento con el antagonista revirtió estos efectos antiproliferativos en un 70%. El NDGA administrado de manera única disminuyó la viabilidad celular en un 25%, efectos que no se sumaron a los del I₂ y que cancelaron los efectos antiproliferativos de la 6-IL. En ambos tipos celulares la coadministración del antagonista y del inhibidor de la vía LOX no potenciaron sus efectos.

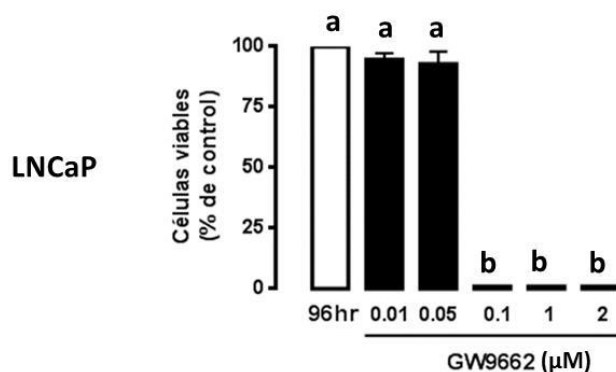


Figura 11. Curva dosis-respuesta de GW9662 en las células LNCaP. Las células se incubaron durante 96 horas con 0.01, 0.05, 0.1, 1 y 2 μ M de GW9662. La barra blanca representa el vehículo y las barras negras representan los tratamientos. El número de células viables a las 96 horas de tratamiento fue normalizado respecto al grupo no tratado (100 %). Los datos representan la $X \pm DE$. Se utilizó un análisis de varianza de una vía y la prueba pos-hoc de Tukey. n=3 ensayos independientes por duplicado.

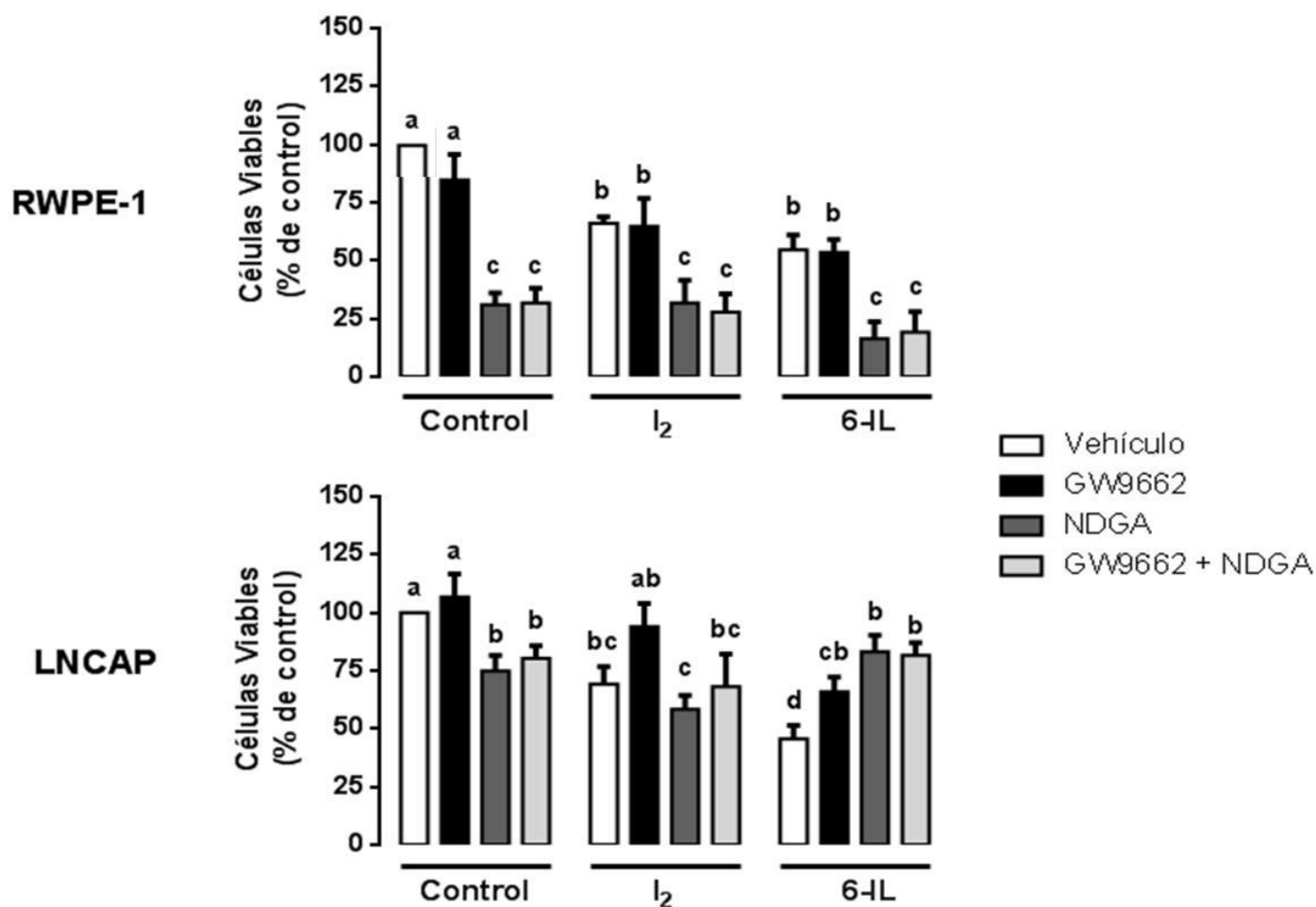


Figura 12. Efecto de la coadministración del antagonista a PPAR gamma (GW9662) y del inhibidor de lipoxigenasas NDGA en los efectos del I₂ y de 6-IL sobre la viabilidad celular. Las células se pre-incubaron durante 12 horas con GW9662. Posteriormente fueron tratadas con I₂, 6-IL y/o NDGA durante 96 horas. El número de células viables a las 96 horas de tratamiento fue normalizado respecto al grupo no tratado (100 %). Los datos representan la $X \pm DE$. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías (compuestos yodados vs inhibidores) y la prueba pos-hoc de Tukey. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$), $n= 3$ ensayos independientes por duplicado.

7.5. Efecto apoptótico de la 6-yodolactona

Se analizó el efecto de 6-IL en la apoptosis y se observó que a las 72 horas de tratamiento, este yodolípido aumenta de manera dosis-dependiente el índice de apoptosis en ambas líneas celulares (Figura 13).

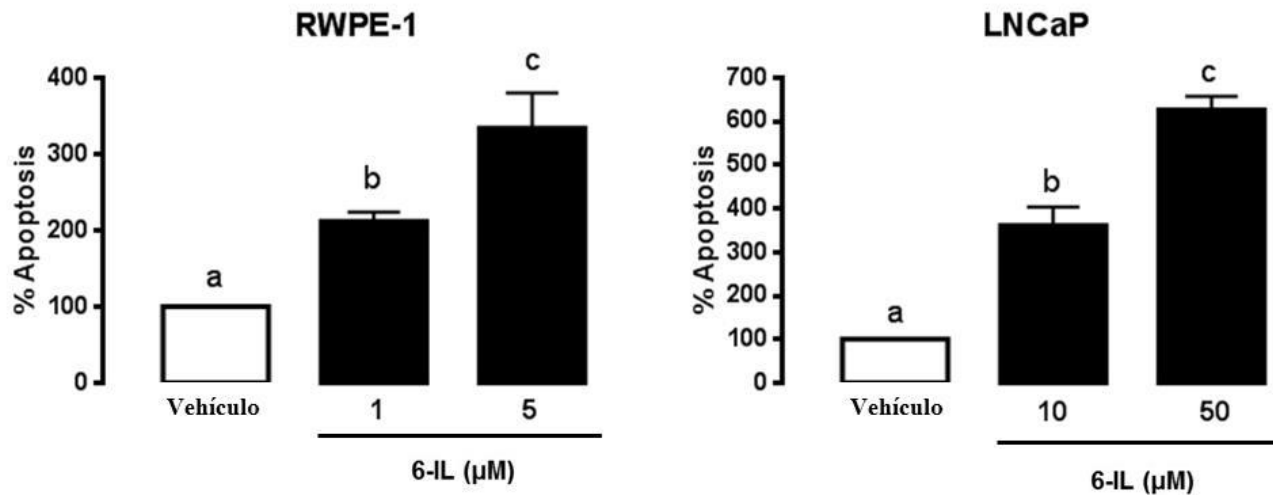


Figura 13. Efecto de la 6-yodolactona en la apoptosis. Las células fueron tratadas con 6-IL durante 72 horas. El grupo control fue incubado con vehículo. El número de células apoptóticas fue normalizado respecto al grupo no tratado (100 %). La apoptosis se determinó con un método fluorescente a través del índice anexina V/calceína. Los datos representan la $X \pm DE$. Para cada línea celular se utilizó un análisis de varianza de una vía y la prueba pos-hoc de Tukey. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 3$ ensayos independientes por duplicado.

7.6. Efecto de la 6-yodolactona sobre la expresión génica

Los resultados de la Figura 14 muestran los efectos del I₂ y 6-IL en la expresión de 15-LOX-1 y PPAR γ . En términos generales las células LNCaP presentan una expresión basal de 6 a 8 veces mayor en comparación con las células RWPE-1. En ambos tipos celulares, el I₂ y la 6-IL inhibieron la expresión de estos genes y esta inhibición se mantuvo en presencia del GW9662.

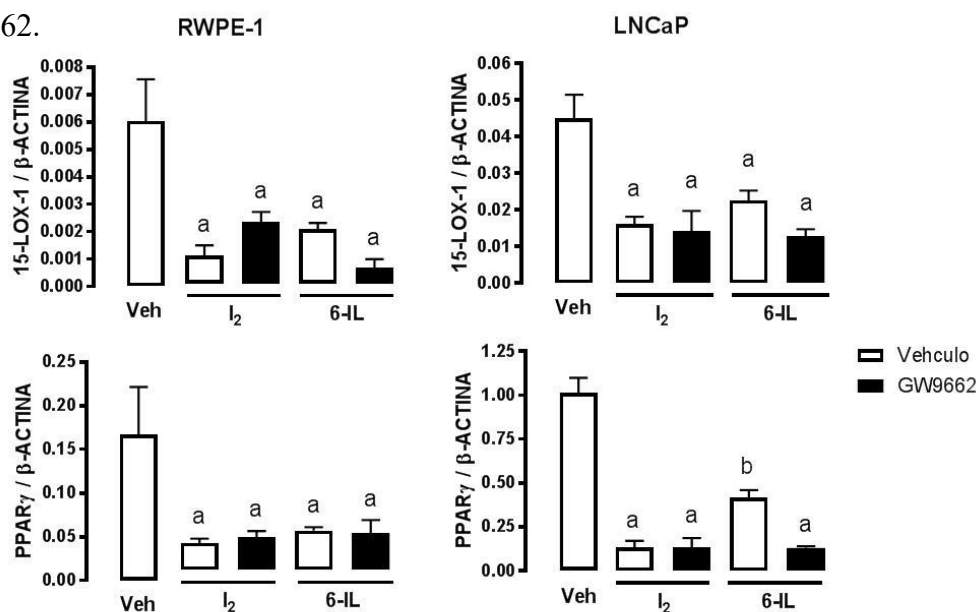


Figura 14. Efecto del I₂ y 6-yodolactona en la expresión de 15-Lipoxigenasa-1 y PPAR gamma. Ambos tipos celulares fueron pre-incubados durante 12 horas con GW9662 (0.05 μ M) y tratados con I₂ (200 μ M) o 6-IL (5 y 50 μ M para RWPE-1 y LNCaP respectivamente) durante 24 horas. El grupo control fue incubado con vehículo. La expresión génica se analizó mediante RT-PCT (tiempo real). La expresión del gen de interés se normalizó en función de la expresión del gen constitutivo β -actina. Los datos representan la $X \pm DE$. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías (compuestos yodados vs antagonista) y la prueba pos-hoc de Tuckey. El grupo vehículo no fue incluido en el análisis de dos vías. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$), $n = 3$ ensayos independientes por duplicado.

7.7. Efecto de la 6-yodolactona en la actividad enzimática de 15-Lipoxigenasa-1

En un sistema libre de células se analizó el curso temporal de la actividad enzimática, utilizando 50 μM de AA como sustrato, en ausencia o presencia de una concentración 50 μM de 6-IL. Los resultados de la Figura 15 muestran un aumento lineal de la actividad 15-LOX-1, en los primeros 60 minutos de la reacción, mientras que una menor actividad de la enzima se observó en presencia de 6-IL. La enzima no presentó actividad, en ausencia de AA y presencia de 6-IL. El NDGA se utilizó como un control negativo del ensayo.

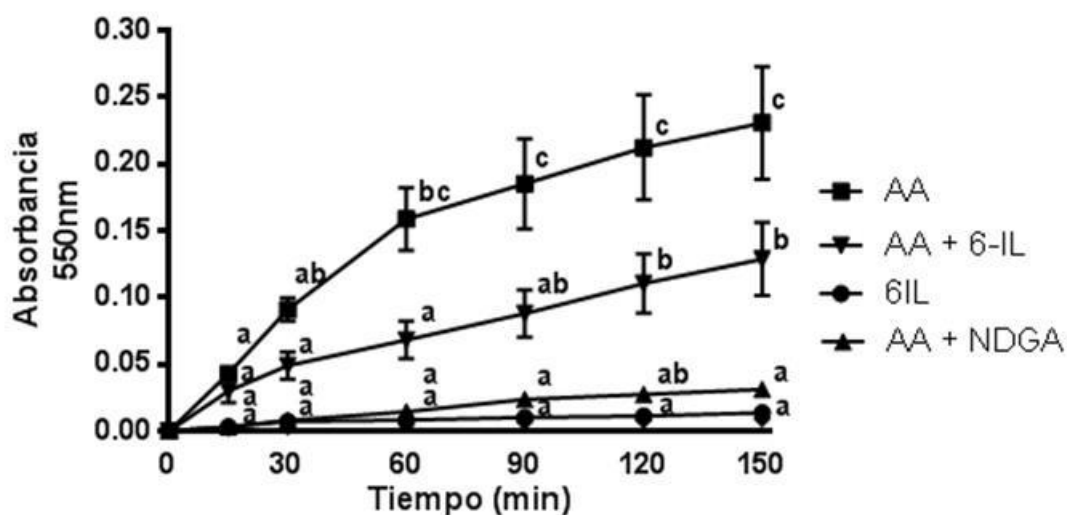


Figura 15. Efecto de la 6-yodolactona en el curso temporal de la actividad enzimática de la 15-Lipoxigenasa-1. La reacción enzimática se llevó a cabo con AA (50 μM) y 15-LOX-1 (140 U/ 20 μl) en ausencia o presencia de 6-IL (50 μM). Se utilizó un inhibidor de 15-LOX-1 (NDGA 50 μM) como un control interno. La reacción se llevó a cabo a 37°C (pH 7.0). La actividad enzimática se determinó a través de la formación del producto (generación de peróxidos). La actividad se expresa en unidades de absorbancia. Los datos representan la $X \pm \text{DE}$. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías y la prueba pos-hoc de Tuckey. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$). $n = 4-6$ ensayos independientes por duplicado.

Los resultados de la Figura 16, muestran la cinética de sustrato en respuesta a concentraciones crecientes de AA. Una menor actividad de 15-LOX-1 se observa cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de 6-IL (50 μ M). Los parámetros cinéticos de actividad máxima (V_{max}) y afinidad (K_m) se calcularon para el AA, a partir de la ecuación de Michaelis-Menten. La Figura 17 muestra una gráfica tipo Lineweaver-Burk (valores recíprocos), y se observa que se obtuvo una V_{max} de 35 fmol/mg/h y una K_m de 10.9 μ M en presencia de AA como sustrato.

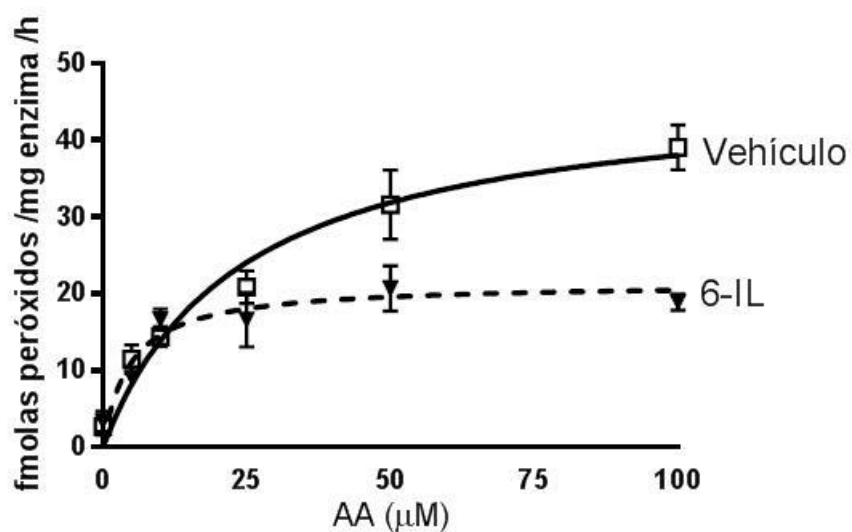


Figura 16. Cinética de sustrato de la actividad enzimática de 15-Lipoxigenasa-1. Este ensayo se realizó con diferentes concentraciones de AA, en ausencia y presencia de 6IL (50 μ M) y 15-LOX-1 (7,106 U/ml). La incubación se llevó a cabo a 37°C, durante 45 minutos. n= 4-6 ensayos independientes por duplicado.

	AA
Vmax	35 ± 2
Km	10.9

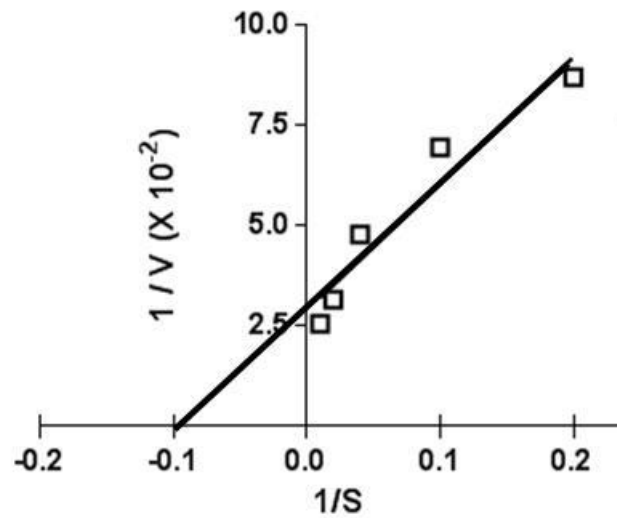


Figura 17. Análisis de la cinética enzimática para sustrato. Los valores fueron transformados en dobles recíprocos y se representa en una gráfica tipo Lineweaver-Burk. La tabla de la parte superior muestra los valores cinéticos calculados. Valores calculados a partir de la ecuación Michaelis-Menten $v = (V_{max} * S / K_m + S)$.

8. DISCUSIONES

En los últimos años se han publicado trabajos muy sólidos que muestran que en ciertos tipos de epitelios cancerosos, el yodo ejerce acciones antiproliferativas y apoptóticas. Estos efectos dependen del aporte y la capacidad de los tejidos de captar yodo y se ha propuesto que la generación de yodolípidos (yodación del ácido araquidónico), podría ser parte de los mecanismos por los cuales el yodo lleva a cabo estos efectos (Aceves et al., 2013). Estudios del grupo han mostrado que la 6-IL actúa como ligando de los receptores PPAR y que parte de los efectos del yodo, pueden ser explicados a través de la activación del complejo 6-IL-PPAR γ (Nuñez-Anita et al., 2009; Nava-Villalba y Aceves, 2014). Estos hallazgos sugieren que además de la prostaglandina 15-PGJ2 y el 13-HODE, la 6-IL forma parte de los ligandos endógenos de los PPAR γ (Matsuyama y Yoshimura, 2009 y Huang et al., 1999).

El antecedente previo de este trabajo mostró que el yodo reduce la viabilidad celular e induce apoptosis en células prostáticas, siendo las cancerosas (LNCaP) más sensibles que las no cancerosas (RWPE-1) (Aranda et al., 2013). Hasta el momento no existen estudios que muestren la formación endógena de 6-IL en el epitelio prostático, pero los resultados de esta tesis mostraron que la administración exógena de este yodolípido reduce la viabilidad celular e induce apoptosis, siendo las RWPE-1 más sensibles que las LNCaP. Con el propósito de evaluar la participación de los PPAR γ y de los inhibidores de lipoxigenasas en estas respuestas, se analizó el efecto de un antagonista específico (GW9662) y de un inhibidor específico de la vía LOX (NDGA). En términos generales se encontró que el antagonista no inhibió el efecto antiproliferativo del I₂ y de la 6-IL en las RWPE-1, pero sí lo hizo en las LNCaP. Por otra parte, el NDGA tuvo efectos antiproliferativos y su presencia no se sumó a los efectos antiproliferativos del I₂ y de la 6-IL en ambos tipos celulares. Los hallazgos de este estudio relacionados con sensibilidad a la 6-IL (RWPE-1) y participación de PPAR γ (LNCaP), no son fáciles de explicar y ponen en evidencia que varios factores están involucrados en estas respuestas como se discute a continuación.

Los efectos antiproliferativos del I₂ y de la 6-IL dependen de la activación de los PPAR γ en las células LNCaP, pero no en las RWPE-1.

En las células LNCaP, el pre-tratamiento con GW9662 canceló en un 90 y 70 % los efectos antiproliferativos del I₂ y 6-IL respectivamente, sugiriendo que estos efectos podrían estar mediados por la activación de PPAR γ . Estudios de otros grupos han mostrado que 15-PGJ₂ reduce la proliferación de células cancerosas, lo cual concuerda con el hecho de que los tumores prostáticos presentan receptores PPAR funcionales (Matsuyama y Yoshimura, 2009). La activación de PPAR γ en células de cáncer prostático induce un aumento en los niveles proteicos de p21, p53 y BAX (Kubota et al., 1998). Estos efectos y vías de señalización son semejantes a los que la 6-IL induce en células de cáncer mamario (Arrollo-Helguera et al., 2008). Por otra parte, los efectos antiproliferativos del I₂ y de la 6-IL en las células RWPE-1, parecen estar mediados por un mecanismo que no involucra la activación de PPAR γ . Estos hallazgos son congruentes con el bajo nivel de expresión de PPAR γ observado en éste y otros estudios (Segawa et al., 2002 y Subbarayan et al., 2006). Existen evidencias que los ligandos de PPAR γ , también actúan a través de mecanismos independientes de este receptor (Chaffer et al., 2006). Los efectos antiproliferativos y/o anti-inflamatorios también pueden ser explicados a través de la degradación proteosomal de cMyc (Akinyeke T y Stewar L, 2011), inactivación de NF κ B (a través de inhibición de cinasa IKK, mediante formación de complejo ligando-cinasa (Castrillo et al., 2000) y pérdida de la función de Bcl-2 (Shiau et al., 2005). Hasta el momento no existen estudios que analicen el efecto de la 6-IL en estos mecanismos no nucleares.

Los efecto antiproliferativos del I₂ y de la 6-IL no se potencian con la coadministración del inhibidor de lipoxigenasas

Como se esperaba, la administración del NDGA disminuyó la viabilidad en ambos tipos celulares, siendo las RWPE-1 más sensibles que las LNCaP. Estos hallazgos concuerdan con estudios donde se observa que la proliferación de células prostáticas PC3 es inhibida por NDGA (Ghosh y Myers, 1997). No existen estudios que analicen los efectos de este inhibidor en células no tumorales de próstata, sin embargo otros estudios en células

mononucleares de sangre periférica (PBMC) el NDGA no impactó en la viabilidad celular a dosis que sí afectaron a células leucémicas (Leon D et al., 2016). En este estudio llama la atención que no se observaron efectos coadyuvantes (antiproliferativos) del I₂ y de 6-IL con el NDGA en ninguno de los tipos celulares. Más aún, nuestros datos mostraron que en las células LNCaP, el NDGA canceló el efecto antiproliferativo de la 6-IL. Por un lado se conoce que en las células tumorales, la fosforilación de PPAR γ (vía MAPk) es un mecanismo que inactiva su vía de señalización. Por otra parte, se conoce que los metabolitos de la vía de LOX activan la vía MAPk y la proliferación celular (Hsi et al., 2001), por lo cual resultó paradójico que el NDGA haya cancelado el efecto antiproliferativo de la 6-IL. Sin embargo, un estudio en queratinocitos evidenció que el NDGA (0.2 – 2 μ M) inhibe la actividad de los sitios PPRE y bloquea la unión de ligando a receptor (Wy14643 y troglitazona para PPAR α y PPAR γ respectivamente). Ésta inhibición fue reversible al añadir concentraciones crecientes de sus agonistas (Thuillier et al., 2002). En conjunto, aunque se conoce que la sensibilidad del NDGA varía de acuerdo al tipo celular, se requieren hacer estudios con dosis inferiores de NDGA en estas células para determinar los mecanismos implicados en estas respuestas, e incluso descartar interacciones químicas entre el NDGA y 6-IL.

En ambos tipos celulares, el I₂ y la 6-IL reducen la expresión génica de PPAR γ y 15-LOX-1 por un mecanismo independiente a PPAR γ .

El tratamiento con I₂ o 6-IL disminuyó significativamente la expresión de PPAR γ . Este dato contrasta con estudios del grupo en células de cáncer mamario que muestran que la 6-IL regula positivamente la expresión de este receptor (Nuñez-Anita et al., 2011). Sin embargo, hay evidencia que en las células LNCaP, el tratamiento con troglitazona (agonista sintético PPAR γ) no modifica la expresión de este receptor (Ban et al., 2011), o bien la aumenta con el tratamiento con 15-PGJ₂ (ligando endógeno) (Sabichi et al., 2004). Estos hallazgos ponen en evidencia que la regulación génica de este receptor (estimulación o inhibición), depende del tipo de ligando y de la línea celular. Además, nuestro estudio mostró que el antagonista a PPAR γ no revierte los efectos inhibidores del I₂ y de la 6-IL

sobre la expresión de este receptor, revelando que su activación no regula la transcripción de su propio gen (Fajas et al., 1997).

En relación a la expresión basal de 15-LOX-1, se encontró que las células LNCaP presentan niveles 7 veces más altos que las RWPE-1. Este dato concuerda con la noción de que esta enzima está presente en tumores prostáticos y prácticamente está ausente en el epitelio normal (Hsi et al., 2001). En ambos tipos celulares se observó que el I₂ y la 6-IL reducen la expresión de 15-LOX-1 a través de un mecanismo independiente a PPAR γ . La región promotora del gen de 15-LOX-1 contiene sitios AP-2 y SP1 pero al igual que el gen de PPAR γ , no contiene sitios PPRE (Kritzik et al., 1997). En conjunto nuestros resultados mostraron que los efectos inhibidores del I₂ y de 6-IL sobre la expresión de PPAR γ y 15-LOX-1 son independientes del tipo celular y de la activación de PPAR γ .

Posible relevancia funcional del efecto inhibidor de 6-IL sobre actividad de 15-LOX-1.

Otro de los hallazgos importantes de este estudio, fue la inhibición directa de la 6-IL sobre la actividad enzimática de 15-LOX-1. En las células prostáticas no se analizaron los efectos del I₂ y de la 6-IL sobre los metabolitos de 15 LOX-1, pero está bien establecido que dependiendo del tipo de sustrato (ácido linoleico) o (AA, DHA), esta enzima puede dar lugar a la generación de lípidos protumorales (13-HODE) o antitumorales (15-HETE, 17-DHA), respectivamente (Kelavkar et al., 2007 y Shappell et al., 2001). Se conoce que las células cancerosas presentan altas concentraciones de 13-HODE y que esto es parte de los mecanismos que mantienen la proliferación celular, angiogénesis e inflamación (Hsi et al., 2002 y Kelavkar et al., 2004). Análisis lipídicos muestran que las células LNCaP presentan niveles en el recambio del AA 10 veces mayores que los de ácido linoléico, y que la afinidad de 15-LOX-1 por uno u otro sustrato es de 25 y 10 μ M, respectivamente (Kilti et al 1999). Estos hallazgos indican que el efecto global (anti o protumoral) de la activación de 15-LOX-1 depende de varios factores como son concentración y tipo de sustrato (Ivanov et al., 2015). Nuestros resultados generados a partir del sistema libre de células, sugieren que la inhibición directa de la 15-LOX-1 por acción de 6-IL, podría acompañarse de una reducción en los niveles de 13-(S)-HODE, sin embargo esto tiene que ser corroborado en las células cancerosas.

Se ha reportado que parte del mecanismo de acción de algunos fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID), involucra la inhibición de las enzimas LOX o COX y/o la activación de PPAR γ . Como se muestra en la Figura 16, estas moléculas, incluyendo la 6-IL, comparten características estructurales como son la presencia de una cadena hidrocarbonada y/o un grupo funcional ácido, generalmente un carboxilato (COOH) o un sustituyente enólico (OH) (Lehmann et al., 1997).

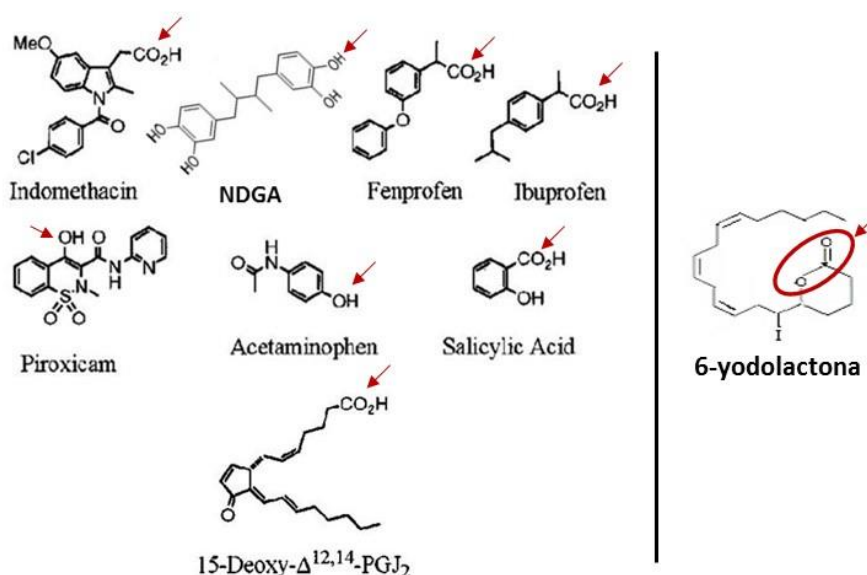


Figura 18. Características estructurales de anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS). La flecha roja indica el grupo función ácido. Indometacina y NDGA son inhibidores de las enzimas LOX, mientras que el resto de fármacos son inhibidores de las enzimas COX. A excepción del acetaminofen y del ácido salicílico, todas estas moléculas actúan como ligandos de PPAR γ . Modificado de Lehmann et al., 1997.

Sensibilidad al tratamiento y paralelismo entre I₂ y 6-IL

En ambos tipos celulares, se observó una respuesta paralela entre I₂ y 6-IL sobre la viabilidad celular, apoptosis y expresión génica, sugiriendo que parte de los efectos del I₂ podrían estar mediados a través de la generación endógena de 6-IL. Sin embargo,

observamos diferente sensibilidad ante el tratamiento de 6-IL. Las células RWPE-1 fueron mayormente sensibles a este tratamiento, lo cual concuerda con otros autores donde estas células han sido también sensibles a los efectos antiproliferativos de la troglitazona (agonista sintético PPAR γ) y al ácido eicosatetraicoico (ETYA) (agonista endógeno de PPAR γ) (Battaglia et al., 2010). Otro patrón diferencial observado en nuestros resultados fue que la línea no cancerosa fue más sensible a los efectos de la 6-IL, mientras que la cancerosa lo es al I₂ (Aranda et al., 2013). Estas diferencias también han sido reportadas en varios tipos celulares (Arrollo-Helguera et al., 2006; Rosner et al., 2010) y Gartner et al., 2010). Es probable que los efectos de la 6-IL dependan de factores tales como: la capacidad de la célula en generarla y/o internalizarla; estabilidad de la yodolactona, moléculas blanco y contexto celular, etc. En conjunto, nuestros datos mostraron que la 6-IL es un lípido con actividad antiproliferativa y apoptótica en células de próstata, apoyando la noción de que éste podría ser un intermediario en las acciones antitumorales del I₂ (ver modelo propuesto). Desde el punto de vista terapéutico, la alta sensibilidad de las células no tumorales a la 6-IL y al NDGA, nos lleva a proponer que la administración de I₂ sería una opción en el tratamiento de esta patología.

9. CONCLUSIONES

1. Las células no cancerosas fueron más sensibles a los efectos de la 6-IL que las células cancerosas.
2. La 6-IL estimuló la apoptosis y disminuyó tanto la viabilidad celular como la expresión de PPAR γ y 15-LOX-1, en células tumorales y no tumorales de próstata.
3. Los efectos del I₂ y de la 6-IL fueron paralelos (mismo sentido) y estuvieron mediados por mecanismos dependientes e independientes a PPAR γ .
4. El NDGA anuló los efectos de la 6-IL en la viabilidad celular.
5. La 6-IL inhibió la actividad enzimática de 15-LOX-1.

10. MODELO PROPUESTO

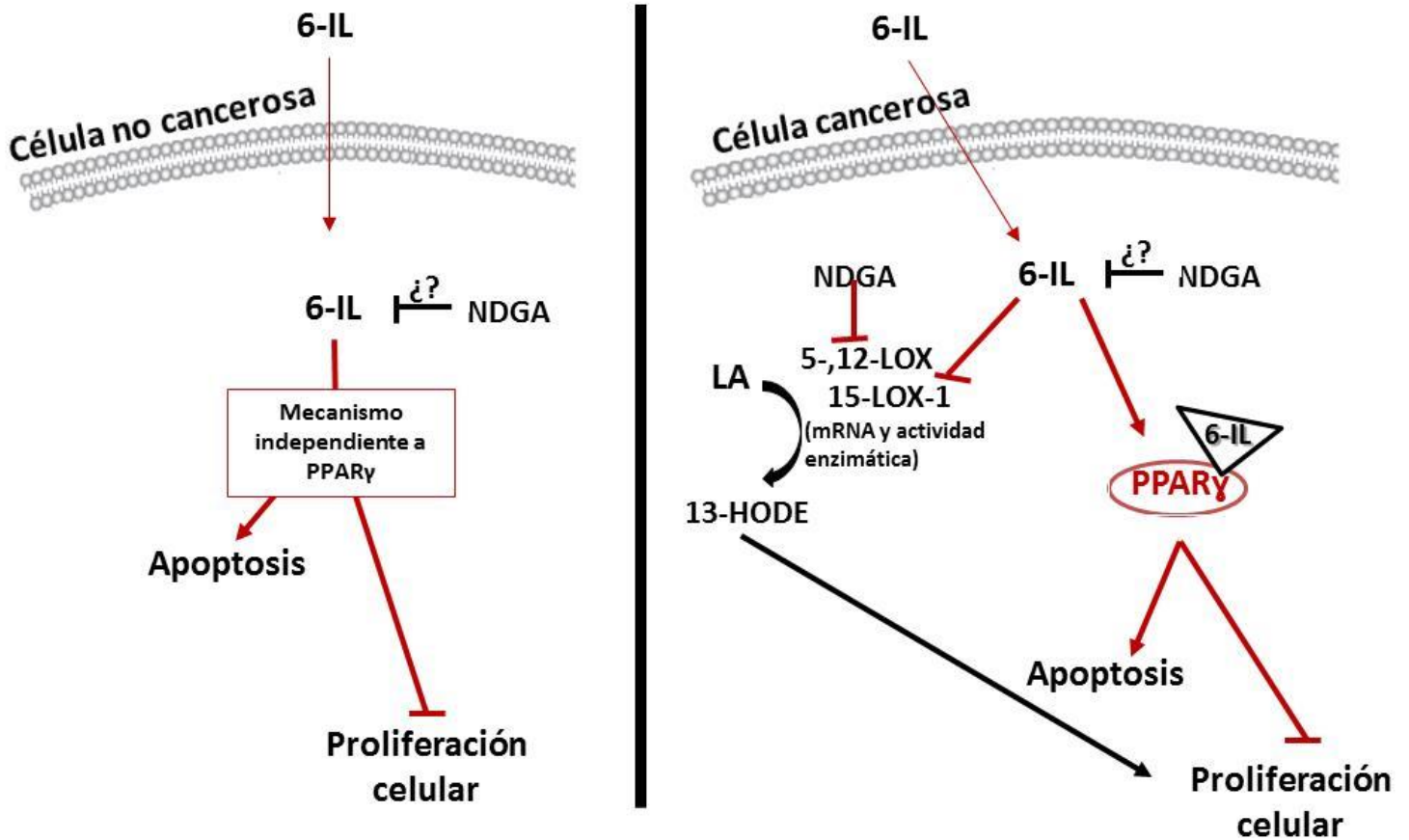


Figura 19. Modelo del mecanismo antiproliferativo de la 6-yodolactona (6-IL) en células no cancerosas y cancerosas de próstata. En la célula no cancerosa se observó que la 6-IL indujo apoptosis e inhibió la proliferación celular, a través de mecanismos independientes a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ). En células cancerosas se observó que la 6-IL indujo apoptosis y disminuyó la proliferación celular a través de un mecanismo dependiente de PPAR γ . Nuestros resultados sugieren que además de PPAR γ , la 15-LOX-1 podría ser un segundo blanco de este yodolípido. Se conoce que en la célula cancerosa la expresión de esta enzima está incrementada y participa en la generación de 13-HODE metabolito proliferativo. En nuestro estudio el NDGA inhibió los efectos antiproliferativos de la 6-IL.

10. BIBLIOGRAFIA

- Aceves C y Anguiano B. 2009. Is iodine an antioxidant and antiproliferative agent for the mammary and prostate glands. In: Comprehensive handbook of iodine. Nutritional, endocrine and pathological aspects. Preedy VR, Burrow GN, Watson RR (eds). Elsevier Life Science. 249-257.
- Aceves C, García-Solis P, Arrollo-Helguera O, Vega-Riveroll L, Delgado G y Anguiano B. 2009. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Mol Cancer*. 33, 1-9.
- Aceves C, Anguiano B y Delgado G. 2013. The extrathyronine actions of iodine as antioxidant, apoptotic and differentiation factor in various tissues. *Thyroid*. 23, 938-946.
- Akinyeke T y Stewart L. 2001. Troglitazone suppresses c-Myc levels in human prostate cancer cells via a PPAR γ -independent mechanism. *Cancer Biol Ther*. 11, 1046-1058.
- Alfaro Y, Delgado G, Cárabez A, Anguiano B y Aceves C. 2013. Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition and cardioprotection. *Mol Cancer*. 12, 1-11.
- Anguiano B, García-Solis P, Delgado G y Aceves C. 2007. Uptake and gene expression with antitumoral doses of iodine in thyroid and mammary gland: evidence that chronic administration has no harmful effects. *Thyroid*. 17, 851-859.
- Aranda N, Sosa S, Delgado G, Aceves C y Anguiano B. 2013. Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in differentiated and undifferentiated human prostate cancer cell lines. *The prostate*. 73, 31-41.
- Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G y Aceves C. 2006. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer*. 13, 1147-1158.

- Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. 2008. Signalling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-yodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer*. 15, 1003-11.
- Baetz T, Eisenhauer E, Siu L, MacLean M, Doppler K, Walsh W, Fisher B, Khan A, de Alwis D, Weitzman A, Brail L y Moore M. 2007. A phase I study of oral LY293111 given daily in combination with irinotecan in patients with solid tumours. *Invest New Drugs*. 25, 217-225.
- Ban J, Oh J, Son S, Won D, Song H, Han S, Moon D, Kang K, Song M y Hong J. 2011. Troglitazone, a PPAR agonist, inhibits human prostate cancer cell growth through inactivation of NFkB via suppression of GSK-3 β expression. *Cancer Biol Ther*. 12, 288-296.
- Battaglia S, Maguireb O, Thornea J, Hornungb L, Doigb C, Luic S, Suchestonc L, Bianchib A, Khanime F, Gommersalla L, Coultera H, Rakhaa S, Giddingsf I, O`Neillla L, Cooper C, McCabea C, Buncee C y Campbell M. 2010. Elevated NCOR1 disrupts PPAR alpha/gamma signaling in prostate cancer and forms a targetable epigenetic lesion. *Carcinogenesis*. 1, 1-20.
- Behl T, Kaur I, Goel H y Kotwani A. 2016. Implications of the endogenous PPAR-gamma ligand, 15-deoxy-delta-12, 14 prostaglandin J2, in diabetic retinopathy. *Life Sci*. 153, 93-99.
- Berquin I, Edwards I, Kridel S y Chen Y. 2011. Polyunsaturated fatty acid metabolism in prostate cancer. *Cancer Metastasis*. 30, 295-309.
- Brune B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, Von Knethen A y Weigert A. 2013. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid. Redox. Signal*. 19, 595-637.
- Calder P. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory process: nutrition or pharmacology?. *Br J Clin Pharmacol*. 75, 645-662.

- Castrillo A, Díaz-Guerra M, Hortelano S, Martín-Sanz P y Boscá L. 2000. Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-Deoxy- Δ 12,14-prostalandin J2 in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol.* 20, 1692-1698.
- Chaffer C, Thomas D, Thompson E y Williams E. 2006. PPAR γ -independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer.* 6, 53-66.
- Clayden J., Greeves N., Warren S. y Wothers P. 2001. *Organic Chemistry.* 1ra. ed. 692:693.
- Collett G, Betts A, Johnson M, Pulimood A, Cook S, Neal D y Robson C. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor α is an androgen responsive gene in human prostate and is highly expressed in prostatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 6, 3241-3248.
- Corton J, Anderson S y Stauber A. 2000. Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the action of peroxisome proliferators. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol.* 40, 491-518.
- Daynes R y Jonnes D. 2002. Emerging roles of PPARS in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2, 748-759.
- Dennis E y Norris P. 2015. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 15, 511-523.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden B, Peters J, González F, Fruchart J, Tedqui A, Haegeman G y Staels B. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.* 274, 32048-32054.
- Delerive P, Fruchart J y Staels B. 2001. Peroxisome proliferator activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* 169, 453-459.
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz M, Colombel J y Auwerx J. 2001.

- Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutics strategies. *J Exp Med.* 193, 827-838.
- Di Renzo J, Soderstrom M, Kurokawa R, Ogliastro M, Ricote M, Ingrey S, Horlein A, Rosendeld M y Glass C. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol.* 17, 2166-2176.
- Ding Z, Mizeracki A, Hu C y Mehta J. 2013. LOX-1 deletion and macrophage trafficking in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 440, 210-214.
- Dobson E, Barrow C, Kralovec J y Adcock J. 2013. Controlled formation of mono- and dihydroxy-resolvins from EPA and DHA using soybean 15-lipoxygenase. *J Lipid Res.* 54, 1439-1447.
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G y Wahli.W. 1992. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 68, 879-887.
- Dugrillon A, Uedelhoven W, Pisarev M, Bechtner G y Gärtner R. 1994. Identification of δ -lactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Horm Metab Res.* 26, 465-9.
- Duvall M y Levy B. 2015. DHA- and EPA derived resolvins, protectins and maresins in airway inflammation. *Eur J Pharmacol.* 1, 1-12.
- Eleftheriadis N, Thee S, Biesebeek J, Wouden P, Baas B y Dekker F. 2015. Identification of 6-benzyloxysalicylates as a novel class of inhibitors of 15-lipoxygenase-1. *Eur J Med Chem.* 94, 265-275.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre A, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart J, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs M, Staels B, Vidal H y Auwerx J. 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 272, 18779-89.

- Friedlander T, Weinberg V, Huang Y, Mi J, Formaker C, Small E, Harzstark A, Lin A, Fong L y Ryan C. 2012. A phase II study of insulin-like growth factor receptor inhibition with nordihidroguaiaretic acid in men with non-metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Oncol Rep.* 1, 3-9.
- García-Solis P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guamán R, Nandi S, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O y Aceves C. 2005. Inhibition of induced MNU mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not iodide (I⁻) treatment. Evidence that I₂ prevents cancer promotion. *Mol. Cell. Endocr.* 236, 49-57.
- Gartner R, Rank P y Ander B. 2010. The role of iodine and δ -iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells. *Hormones.* 9, 60-66.
- Ghosh J y Myers Ch. 1997. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys. Res.* 235, 418-423.
- Ghosh J. y Myers Ch. 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Medical Sciences.* 95, 13182-13187. *Proc Natl Acad Sci.* 95, 13182-13187.
- Greene E, Huang S, Serhan C y Panigrahy D. 2011. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 96, 27-36.
- Grygiel G. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications- a review. *Nutr J.* 13-17.
- Harizi H, Corcuff J y Gualde N. 2008. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Cell Press.* 14, 461-469.
- Hatton J y Yee L. 2002. Clinical use of PPAR γ ligands in cancer. *PPAR Res.* 2008, 1-13.
- Her N, Jeonog S, Cho K, Ha T, Han J, Ko K, Park S, Lee J, Lee M, Ryu B y Chi S. 2013. PPAR δ promotes oncogenic redirection of TGR- β 1 signaling through the activation of the ABCA1-Cav1 pathway. *Cell Cycle.* 12, 1521-1535.

- His L, Wilson L, Nixon J y Eling T. 2001. 15-Lipoxygenase-1 metabolites down-regulate peroxisome proliferator-activated receptor γ via the MAPK signalling pathway. *J Biol Chem.* 276, 34545-34552.
- Hsi L, Wilson L y Eling T. 2002. Opposing effects of 15-lipoxygenase-1 and -2 metabolites on MAPK signalling in prostate alteration in peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem.* 43, 40549-40556.
- Huang J, Welch J, Ricote M, Binder C, Willson T, Kelly C, Witztum J, Funk C, Conrad D y Glass C. 1999. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15 lipoxygenase. *Nature.* 400, 378-382.
- Ivanov I, Kuhn H y Heydeck D. 2015. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene.* 573, 1-32.
- Jankun J, Aleem A, Malgorzewicz S, Szkundlarek M, Zavodszky M, DeWitt D, Feig M, Selman S y Jankun E. 2006. Synthetic curcuminoids modulate the arachidonic acid metabolism of human platelet 12-lipoxygenase and reduce sprout formation of human endothelial cells. *Mol Cancer Ther.* 5, 1371-1382.
- Kandouz M, Nie D, Pidgeon G, Krishnamoorthy S, Maddipati K y Honn K. 2003. Platelet-type 12-lipoxygenase activates NF- κ B in prostate cancer cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 71, 189-204.
- Kelavkar U, Harya N, Hutzley J, Bacich D, Monzon F, Chandran U, Dhir R y O'keefe D. 2004. Overexpression of 12/15-lipoxygenase, an ortholog of human 15-lipoxygenase-1, in the prostate tumors of TRAMP mice. *Neoplasia.* 6, 821-830.
- Kritzik M, Ziober A, Dicharry S, Conrad D y Sigal E. 1997. Characterization and sequence of an additional 15-lipoxygenase transcript and of the human gene. *Biochim Biophys Acta.* 1352:267-281.

- Kotz J, Treichel P y Weaver G. 2006. Chemistry and chemical reactivity. Thomson brooks/cole. 6ta ed. 82-87, 110-115, 372-382.
- Kozak K, Prusakiewicz J, Rowlinson S, Schneider C y Mernett L. 2001. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide. 2001. *J Biol Chem.* 276, 30072-30077.
- Krishnan A y Feldman D. 2010. Molecular pathways mediating the anti-inflammatory effects of calcitriol: implications for prostate cancer chemoprevention and treatment. *Endocr Relat Cancer.* 17, 19-38.
- Kuhn H y Borchert A. 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radical Biol Mol.* 2, 154-172.
- Kuhn H, Banthya S y Van Leyen K. 2014. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta.* 1842, 1388-1398.
- Kung H. 2011. Targeting kinases and autophagy in prostate cancer. *Horm Canc.* 2, 38-46.
- Kupper F, Carpenter L, McFiggans G, Palmere C, Waite T, Boneberg E, Woitsch S, Weiller M, Abela R, Grolimund D, Potin P, Butler A, Luther III G, Kroneck P, Meyer-Klaucke W y Feiters M. 2009. Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proc Natl Acad Sci.* 105, 6954-6958.
- Laneuville O, Breuer D, Xu N, Huang Z, Gage D, Watson J, Lagarde M, DeWitt D y Smith W. 1995. Fatty acid substrate specificities of human prostaglandin endoperoxide H synthase -1 and -2. Formation of 12-hydroxy-9z, 13e/z, 15z- octadecatrienoic acids from alpha-linolenic acid. *J Biol Chem.* 270, 19330-19336.
- Leesnitzer L, Parks L, Bledsoe R, Cobb J, Collins J, Consler T, Davis R, Hull-ryde E, Lenhard J, Patel L, Plunket K, Shenk J, Stimmel J, Therapontos C, Willson T y Blanchard S. 2002. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry,* 41, 6640-6650.

- Lehmann J, Lenhard J, Oliver B, Ringold G y Kliewer W. 1997. Peroxisome proliferator activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non steroidal anti inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 272, 3406-3410.
- Leon D, Parada D, Vargas-Uribe M, Perez A, Ojeda L, Zambrano A, Reyes A y Salas M. 2016. Effecto of nordihydroguaiaretic acido n cell viability and glucose transport in human leukemic cell lines. *FEBS Open Bio.* 23, 1000-1007.
- Lepley R. y Fitzpatrick F. 1994. Irreversible inactivation of 5-Lipoxygenase by Leukotriene 4. *J Biol Chem.* 269, 2627-2631.
- Li M, Pscual G y Glass C. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor γ - dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cel Biol.* 20, 4699-4707.
- Lu G, Tsai A, Van W y Kulmacz R. 1999. Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase -1 and -2. *J Biol Chem.* 274, 16162-16167.
- Lyles B, Akinyeke T, Moss P y Stewart L. 2009. Thiazolidinediones regulate expression of cell cycle proteins in human prostate cancer cells via PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent pathways. *Cell Cycle.* 8, 268-277.
- McCabe N, Selman S y Jankun J. 2006. Vascular endothelial growth factor production in human prostate cancer cells is stimulated by overexpression of platelet 12-lipoxygenase. *Prostate.* 66, 779-787.
- Matsuyama M y Yoshimura R. 2009. The target of arachidonic acid pathway is a new anticancer strategy for human préstate cancer. *Biologics.* 2, 725-732.
- McKenna N y O'Malley B. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 108, 465-474.
- Mendieta I, Nuñez-Anita E, Delgado G, Aceves C. 2011. Differential effect of iodine on the implantation and metastatic potential of xenografts from two different human breast cancer cell lines (abstract). *Cancer Res.* 71 (8 Suppl):Abstract nr 4224.

- Meng H, Shen Y, Shen J, Zhou F, Shen S y Das U. 2013. Effecto of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids on prostate cáncer (PC-3) and prostate epitelial (RWPE-1) cells in vitro. *Lipids Health Dis.* 160, 1-14.
- Monteagudo E, Caro H, Veleiro A, Pisarev M y Burton G. 1990. Synthesis and characterization of iodinated derivatives of arachidonic acid. *Anales de la Asociación de Química de Argentina.* 78, 31-36.
- Morrison R. y Boyd R. 1990. *Química Orgánica.* 5ta. ed. Addison-Wesley Iberoamericana. 293-319 y 859.
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans R, Martin K, Zhang M, Fletcher C, Singer S y Spiegelman B. 1998. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell.* 1, 465-470.
- Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman D, Oh W, Demetri G, Figg W, Zhou X, Engi C, Spiegelman B y Kantoff P. 2000. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *PNAS.* 97, 10990-10995.
- Nagata D, Hashimoto Y, Nakanishi M, Naruyama H, Okada S, Ando R, Tozawa K y Kohri K. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and growth inhibition by its ligands in prostate cancer. *Cancer Detec Prev.* 32, 259-266.
- Nava-Villalba M y Aceves C. 2014. 6-iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 112, 27-33.
- Nie D, Che M, Grignon D, Tang K y Honn K. 2002. Role of eicosanoids in prostate cancer progression. *Kluwer Aca. Pub. Prostate Cancer: New Horizons in Research and Treatment,* 59-70.
- Nguyen M, Nguyen D, Yoo J, Myung P, Kim M, Soak D. 2013. Effect of endocannabinoids on soybean lipoxygenase-1 activity. *Bioorg Chem.* 49, 24-32.

- Núñez-Anita R, Arroyo-Helguera O, Cajero J., López B., Aceves C. 2009. A complex between 6 iodolactone and the peroxisome proliferator activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89, 34:42.
- Núñez-Anita R, Cajero J y Aceves C. 2011. Peroxisome proliferator activated receptor. Role of isoform gamma in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 11, 775-786.
- Olvera-Caltzontzin P, Delgado G, Aceves C, Anguiano B. 2013. Iodine uptake and prostate cancer in the TRAMP mouse model. *Mol Med.* 19, 409-416.
- Patel M, Kurek C y Dong Q. 2008. The arachidonic acid pathway and its role in prostate cancer development and progression. *J Urol.* 179, 1668-1675.
- Quintero M, Delgado-González E, Aceves C y Anguiano B. 2015. Iodine and oxidative stress in a rat model of prostatic hyperplasia. V meeting of the free radicals and oxidative stress branch at the Mexican biochemical society. Vista Hermosa, Morelos.
- Rosner H, Torremante P, Moller W y Gartner R. 2010. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 118, 410-419.
- Ruzicka T. 1992. The role of the epidermal 12-hydroxyeicosatetraenoic acid receptor in the skin. *Eicosanoids.* 5:63-65.
- Sabichi A, Subbarayan V, Llansa N, Lippman S y Menter D. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses cyclooxygenase-2 expression in human prostate cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11, 1704-1709.
- Sarveswarana S, Thamilselvana V, Brodieb C y Ghosha J. 2011. Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in prostate cancer cells via down regulation of protein kinase C-epsilon. *Biochim Biophys Acta.* 1813, 2108-2117.

- Schneider C, Pratt D, Porter N y Brash A. 2007. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol.* 5, 473-488.
- Schnurr K, Belkner J, Ursini F, Schewe T y Kuhn H. 1996. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *J Biol Chem.* 271, 4653-4658.
- Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, Nakatani T, Wada S, Kawahito Y, Kishimoto T y Sano H. 2002. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate.* 51, 108-116.
- Shappell S, Gupta R, Manning S, Whitehead R, Boeglin W, Schneider C, Case T, Price J, Jack G, Wheeler T, Matusik R, Brash A y DuBois R. 2001. 15S-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Activates Peroxisome Proliferator-activated receptor γ and inhibits proliferation in PC3 Prostate Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 61, 497-503.
- Shiau C, Yang C, Kulp S, Chen K, Chen C, Huang J, Chen C. 2005. Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPAR gamma. *Cancer Res.* 15, 1561-1569.
- Shrivastava A, Tiwari M, Sinha R, Kumar A, Balapure A, Baipai V, Sharma R, Mitra K, Tandon A y Godbole M. 2006. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *J Biol Chem.* 281, 19762-19771.
- Soriano O, Delgado G, Anguiano B, Petrosyan P, Molina-Servín E, Gonsebatt M y Aceves C. 2011. Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors: association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocr Relat Cancer.* 18, 529-539.
- Subbarayan V, Krieg P, Hsi L, Kim J, Yang P, Sabichi A, Llansa N, Mendoza, G, Logothetis C, Newman R, Lippman S y Menter D. 2006. 15-lipoxygenase-2 gene regulation by its product 15-(s)-hydroxyeicosatetraenoic acid through a negative

- feedback mechanism that involves peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Oncogene*. 44, 6015-6025.
- Suchanek K, May F, Robinson J, Lee W, Holman N, Monteith G y Roberts-Thomson S. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog*. 34, 165-171.
- Tang S, Bhatia B, Madonado C, Yang P, Newman R, Liu J, Chandra D, Traag J, Klein R, Fischer S, Chopra D, Shen J, Zhau H, Cheng L y Tang D. 2002. Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. *J Biol Chem*. 277, 16189-16201.
- Tang D, Bhatia B, Tang S y Schneider-Broussard R. 2004. 15-Lipoxygenase 2 (15-LOX2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 82, 135-146.
- Tennant J. 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*. 2, 685-694.
- Tereshita Y, Sasaki H, Haruki N, Nishiwaki T, Ishiguro H, Shibata Y, Kudo J, Konishi S, Kato J, Koyama H, Kimura M, Sato A, Shinoda N, Kuwabara Y y Fujii Y. 2002. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression is correlated with poor prognosis in patients with esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 32, 238-243.
- Thuillier P, Brash A, Kehrer J, Stimmels J, Leesnitzer L, Yang P, Newman R y Fischer S. 2002. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-mediated keratinocyte differentiation by lipoxygenase inhibitors. *Biochem J*. 366, 901-910.
- Tolon R, Castillo A, Jimenez-Lara A y Aranda A. 2000. Association with Ets-1 causes ligand and AF2 independent activation of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*. 20, 8793-8802.

- Vendramini D y Carvalho J. 2012. Molecular link mechanism between inflammation and cáncer. *Curr Pharm Des.* 26, 3831-3852.
- Wang X, Zhan X, Li X, Yu J y Liu X. 2014. MicroRNA-185 regulates expression of lipid metabolism genes and improves insulin sensitivity in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 20, 17914-17923.
- Wecksler A., Kenyon V., Deschamps J. y Theodore R. 2008. Kinetic and Structural Investigations of the Allosteric Site in Human Epithelial 15-Lipoxygenase-2. *Biochemistry.* 47, 7364-7375.
- Weng J, Chen C, Pinzone J, Ringel M y Che C. 2006. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolinediones. *Endocrine Relat Cancer.* 13, 401-413.
- Wiesner R, Suzuki H, Walther M, Yamamoto S y Kuhn H. 2003. Suicidal inactivation of the rabbit 15-lipoxygenase by 15s-HpETE is paralleled by covalent modification of active site peptides. *Elsevier.* 34, 304-315.
- Wu T, Niu H, Chen L, Cheng J y Tong Y. 2016. Increase of human prostate cancer cell (DU145) apoptosis by telmisartan through PPAR-delta pathway. *Eu J Pharmacol.* 15, 35-42.
- Yang P, Cartwright C, Li J, Wen S, Prokhorova I, Shureiqi I, Troncoso P, Navone N, Newman R y Kim J. 2012. Arachidonic acid metabolism in human prostate cáncer. *Int J Oncol.* 41, 1495-1503.
- Yang W, Lee D, Chung B, Cho J, Choi Y, Kim S, Cho I, Kim H, Kim C y Hong S. 2006. Detection rate of prostate cáncer on biopsy according to serum prostate-specific antigen in Korean men: a multicenter study. *Urology.* 67, 333-336.
- Yoshida T, Shiraishi T, Horinaka M, Nakata S, Yasuda T, Goda A, Wakada M, Mizutani Y, Miki T, Nishikawa A y Sakai T. 2007. Lipoxygenase inhibitors induce death receptor 5/TRAIL-R2 expression and sensitize malignant tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Sci.* 98, 1417-1423.

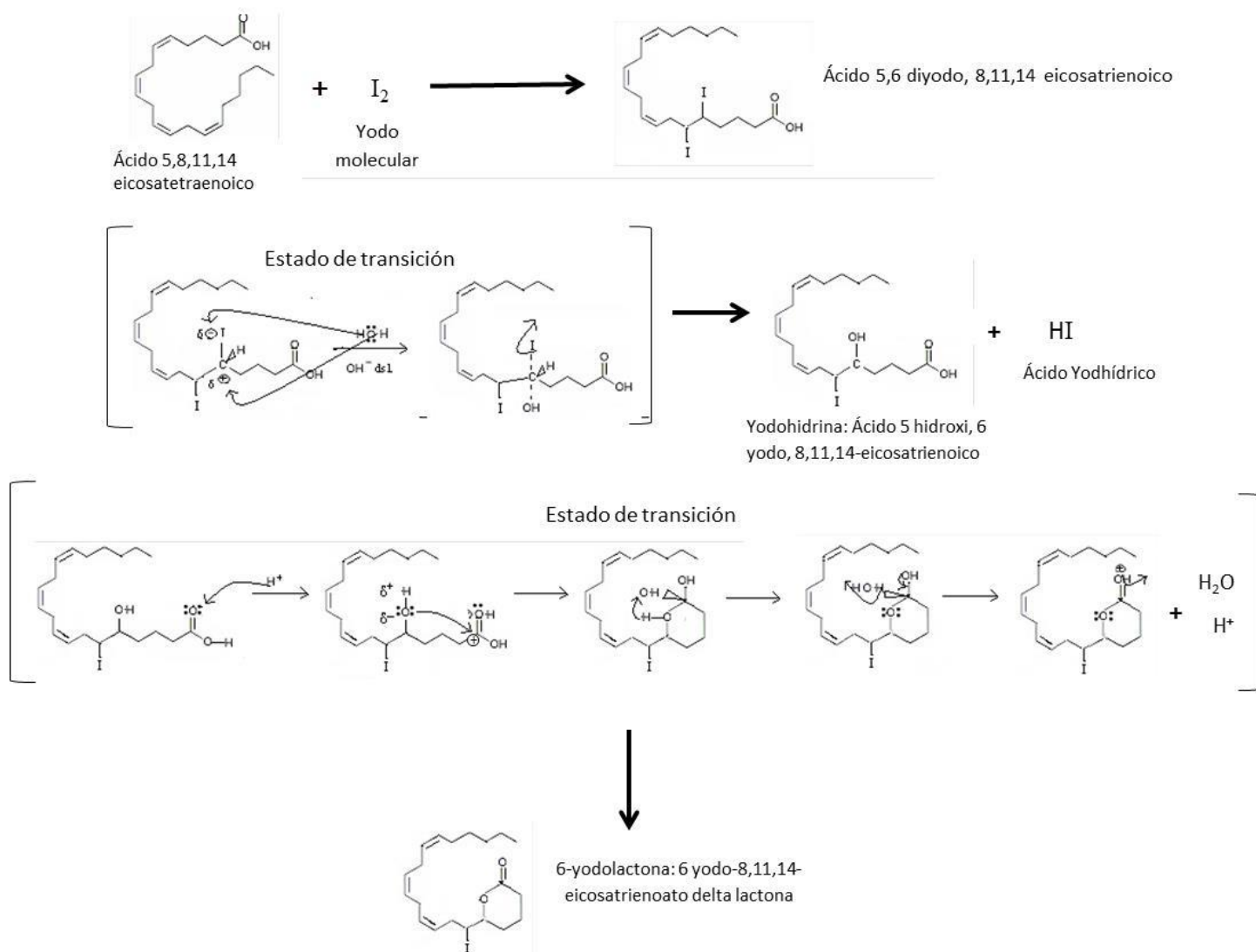
Yu S, Rao S y Reddy J. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med.* 3, 561-572.

Yu S y Reddy J. 2007. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1771, 936-951.

12. APÉNDICE.

12.1. Modelo de síntesis química de 6-yodolactona en un ambiente acuoso.

Se sabe que para la síntesis de lactonas se requiere que un ácido graso no esterificado, presente un sustituyente hidroxilo en su cadena alifática (Boyd Morrison, 1990), el cual en medio acuoso es susceptible de sufrir una esterificación en su propia cadena, lo que dará lugar a la formación de un éster cíclico (lactona) (Clayden, 2001).



Modelo supervisado por el I.B. Carlos Gerardo Zavala Porto. Docente de la asignatura de Química Orgánica, de la Facultad de Química, UAQ.

En un ambiente hidrofóbico (membrana celular), el ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14 eicosatetraenoico) en presencia de I₂, puede ser yodado en su doble enlace (carbono 5 y 6). Posteriormente en un ambiente acuoso (citosol), este ácido graso di-yodado, puede ser atacado por especies más electronegativas que el yodo, como los aniones hidroxilo (OH⁻), los cuales sustituyen a uno de los átomos de yodo (Kotz et al., 2006) (Kupper et al., 2009). De esta manera el ácido araquidónico queda con un sustituyente hidroxilo y un sustituyente yodo, formando una yodohidrina (ácido 5 hidroxil-6 yodo-8,11,14 eicosatrienoico). Así, ésta es capaz de esterificarse para formar una yodolactona (6 yodo-8,11,14-eicosatrienoato delta lactona) (Morrison y Boyd, 1990).