



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

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES QUE ACTIVAN LA PROLIFERACIÓN
DE PEROXISOMAS (PPAR) EN EL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL YODO
MOLECULAR

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

PRESENTA:
C.D. MARIO NAVA VILLALBA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. CARMEN Y. ACEVES VELASCO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

JURIQUILLA QUERÉTARO, MARZO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología del Campus Juriquilla de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en Juriquilla, Querétaro; bajo la dirección de la Dra. Carmen Y. Aceves Velasco.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 176911 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM 201516

Mis estudios de doctorado fueron apoyados a través de la beca otorgada por el CONACyT número de registro: 215708 / 254015 (CONACyT / CVU).

DEDICATORIAS

A la mujer que me dio la vida y quien ha estado a mi lado librando todas mis batallas. Gracias Mamá, gracias Inés

A mi hermano Sergio Luis por haberme enseñado a vivir otra vez. Te extraño siempre

A ti Silvia por hacer de mi vida un mundo de alegría

A mi hermano José Luis por regalarme en mi niñez, su ejemplo

A toda la gente honesta de este país que no se dejará vencer por la triste realidad, ni por la miserable actitud de nuestros gobernantes, México es y será grande, estoy convencido

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y al pueblo de México por darme la educación que ahora tengo y por representar los anhelos más nobles de mi existencia.

A la Dra. Tana por confiar en mí, por prepararme y permitirme cumplir el objetivo de formarme como investigador.

A los miembros de mi comité tutorial Dr. Emilio Rojas del Castillo y Dr. Manuel Aguilar Ramírez por su apoyo académico y orientación continua.

A la Dra. Mercedes Aguilar por regalarme su tiempo tan valioso y ayudarme a entender los métodos que trabajé.

Con especial cariño y agradecimiento a Guadalupe Delgado, a pesar de tu ausencia, vives en todos los logros del laboratorio y en hermosos recuerdos de ahora maestros y doctores.

A los Técnicos Académicos Jaime Pérez Trevilla, Martha Carranza, Andrés Falcón Alcántara, Adriana González Gallardo y Ángeles Edith Espino Saldaña por su apreciable apoyo técnico, paciencia y toda su amabilidad. A los laboratoristas Felipe Ortiz, Antonio Prado Galán, Juana Cárdenas Luna, por su apreciable apoyo y compañerismo.

A mi padre Mario Nava, porque nada me faltó cuando estuviste y por enseñarme a ser fuerte.

A Pepe Ávila por enseñarme a desprenderme de lo material y hacer de mi estadía en Querétaro una verdadera etapa de mi vida.

A mi amiga Beatriz Aldape por tu guía, tu ejemplo, tu confianza, apoyo y por creer en mi.

A mis mentores Dr. Valverde, Dra. Maricela Luna, Dra. Brenda Anguiano y compañeros de laboratorio Elvira Nuñez, Laura Vega, Aura Moreno, Yunúen Alfaro, Evangelina Delgado, Alexander Bontempo, Irasema Mendieta, Lizbeth Trejo, Susana Sosa, Paloma Olvera, Nuri Aranda por compartir aquel tiempo maravilloso.

A mis amigos Ismael Gimete y Mariana Hartasánchez, Pepe Zamudio y Daniela Ávila, Miguel Mendoza y Ana Rivera, Néstor Nazario, Francisco Carmona, Ximena Castillo, Benjamín Velarde, Eduardo Sánchez-Mejorada, Angélica Hernández, David Arredondo, Mariana Ramos, Daniel Ríos, Karla Vega, Eduardo Rojas, Daniel Morales por caminar juntos en aquellos tiempos.

A mis cómplices Janett Soriano, Gerardo Meza, Fabián Ocampo y Marco Torres por haber creado durante mis años de doctorado, lo impensable, saben a qué me refiero.

A mi familia Cuauhtémoc Jiménez, Maricruz Villalba, Jorge Villalba; Elisa Victoria y Violeta González, Celtzin Nava, a mi familia Arriaga (Omar, Reyna, Samantha y Azul), a Tomás.

A mis nuevos amigos Miguel Padilla; Cesar, Claudia y Grecia por todo su cariño y confianza.

A Perlita por ser la luz en aquellos días de oscuridad. A mis amigos distantes Edgar, Bety, Santos, Ángel, a los que me faltaron y como no, al Pere también.

Cuando volteo, los veo a todos y sé que soy muy afortunado.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
Glándula mamaria.....	4
Cáncer mamario.....	6
Epidemiología del cáncer mamario en México	9
Factores de riesgo	10
Factores de protección (la dieta, ingesta de yodo).....	13
Yodo.....	16
Transformación de ácido araquidónico (AA) a 6-yodolactona (6-IL, 5-hidroxi-6-yodo-8-11-14-eicosatrienoico- δ -lactona)	18
Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs, Peroxisomal Proliferators-Activated Receptors).....	19
Asociación de PPARs y cáncer, participación en neoplasias malignas de mama.	20
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
Hipótesis	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Materiales.....	23
Cultivos celulares.....	23
Identificación de 6-IL y su sustrato en células normales y tumorales, tratadas o no con I ₂	24
Síntesis de 6-IL (5-hidroxi-6-iodo-8-11-14-eicosatrienoico- δ -lactona)	24
Extracción de lípidos de cultivos celulares y metanólisis alcalina de extractos lipídicos para la obtención de AA total.....	26
Identificación de AA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) en fase reversa	26
Extracción lipídica de células tratadas con I ₂ para análisis en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, Gas Chromatography – Mass Spectrometry).....	26
Identificación de 6-IL y 14-IL por GC-MS	27
Efecto de la 6-IL y la 14-IL sobre la proliferación de células MCF-7.	28
Participación de los PPAR γ en el efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL	28
Determinación de la proliferación de células MCF-7 tratadas con 6-IL y el antagonista para los PPAR γ GW9662	28
Determinación de la inducción de apoptosis por citometría de flujo en células MCF-7 tratadas con 6-IL y GW9262 (antagonista de los PPAR γ)	29
Sobreexpresión del isotipo gama de los PPAR a través de la infección de adenovirus recombinantes	30
Inducción de la expresión de <i>FASN</i> para confirmar la sobreexpresión funcional de los PPAR γ	34
Determinación de la proliferación celular y apoptosis en células MCF-7 infectadas por AdPPAR γ y tratadas con 6-IL y GW9262	34
Generación de línea celular estable con silenciamiento de los PPAR γ	36
Determinación de la proliferación celular y apoptosis en células MCF-7 RNAi-PPAR γ , Scramble-PPAR γ y WT tratadas con 6-IL.....	39

Efecto de la 6-IL sobre la migración celular.....	41
Evaluación de la participación de la vía extrínseca de la apoptosis en el efecto apoptótico del I ₂ y la 6-IL.	42
Análisis Estadístico.	42
RESULTADOS	43
Las células neoplásicas MCF-7 contienen mayor cantidad de AA que las células de fenotipo normal MCF-12F	43
Síntesis y purificación de yodolactonas	45
La 6-IL y la 14-IL inhiben la proliferación de células MCF-7.....	47
El bloqueo de la activación de los PPAR γ endógenos por el antagonista GW9662 inhibe los efectos de la 6-IL.....	49
La sobreexpresión de los PPAR γ exagera el efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL; sin embargo, estos son bloqueados por el GW9662	51
El silenciamiento de la expresión de los PPAR γ bloquea el efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL	54
La 6-IL inhibe la migración de células MCF-7, sin embargo, este efecto se ve bloqueado cuando hay silenciamiento de los PPAR γ	54
La 6-IL no activa la vía extrínseca de la apoptosis.....	57
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO I	69
Nava-Villalba M, Aceves C. 6-iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. Prostaglandins & Other Lipids Mediators 2014;112:27-33. doi:10.1016/j.prostaglandins.2014.07.001.	
ANEXO II	76
Nava-Villalba M, Nuñez-Anita RE, , Bontempo A, Aceves C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. Molecular Cancer 2015;14:168. doi:10.1186/s12943-015-0436-8.	
ANEXO III	87
Índice de figuras y tablas.	

RESUMEN

El yodo molecular (I_2) tiene efectos antiproliferativos y apoptóticos en modelos de cáncer tanto *in vivo* como *in vitro*. Se piensa que estos efectos son mediados por un derivado de la yodación del ácido araquidónico (AA), la 6-yodolactona (6-IL) y uno de los mecanismos propuestos es que la 6-IL activa el isotipo gama de los Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPAR γ). Además de su papel clásico en mantener la homeostasis de lípidos y glucosa, estos receptores han sido implicados en la inhibición de procesos carcinogénicos. El objetivo de este estudio fue determinar si los PPAR γ participan en los efectos antiproliferativo y apoptótico del I_2 y la 6-IL sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Nuestros resultados muestran que las células neoplásicas MCF-7 tienen mayor cantidad de AA que las células epiteliales de fenotipo normal. Los efectos antiproliferativo y apoptótico generados por la 6-IL requieren la activación de los PPAR γ . Adicionalmente, los ensayos de cicatrización de herida mostraron que la 6-IL es capaz de inhibir la migración de células MCF-7 y que los PPAR γ juega un papel dentro de este fenómeno. Finalmente, los datos obtenidos excluyen la participación de la vía extrínseca en la apoptosis inducida por 6-IL o I_2 . Estos resultados apoyan el mecanismo previamente planteado en el que los efectos antitumorales del I_2 son mediados por la 6-IL y fortalecen la propuesta del uso del I_2 como un coadyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

Palabras clave: yodo, yodolípidos, yodolactona, yodocompuestos, cáncer

ABSTRACT

Molecular iodine (I_2) exhibits antiproliferative and apoptotic effects on *in vivo* and *in vitro* cancer models. These effects are thought to be mediated by an iodinated arachidonic acid (AA) derivative, 6-iodolactone (6-IL), and one of the proposed mechanisms is that the 6-IL activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptors type gamma ($PPAR_\gamma$). These receptors have been implicated in the inhibition of carcinogenic processes, in addition to their classical role in maintaining lipid and glucose homeostasis. The aim of this study was to determine whether the $PPAR_\gamma$ participates in the I_2 /6-IL antiproliferative and apoptotic effects on the mammary cancer cell line MCF-7. Our results show that MCF-7 cells have a greater amount of AA than epithelial normal cells. The antiproliferative and pro-apoptotic effects generated by the 6-IL require the activation of the $PPAR_\gamma$. In addition, wound-healing assays show that the 6-IL is able to inhibit MCF-7 cell migration and that the $PPAR_\gamma$ plays a role in this phenomenon. Finally, the data exclude the participation of the extrinsic apoptotic pathway in 6-IL- and I_2 -induced apoptosis. These results support the previously proposed mechanism, in which the I_2 effects are mediated by the 6-IL, and they provide further support for the use of the I_2 as coadjuvant in breast cancer treatment.

Key words: iodine, iodolipids, iodolactone, iodocompounds, cancer

INTRODUCCIÓN

El yodo molecular (I_2) pero no el yoduro (I^-) o las hormonas tiroideas exhiben efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y apoptóticos en patologías tanto benignas como malignas de las glándulas tiroideas, mamaria y prostática. En el cáncer mamario, el efecto apoptótico del I_2 se ejerce activando tanto la vía Bax-caspasas como al complejo AIF/PARP-1. Sin embargo los componentes celulares que median dicha respuesta aún se están explorando. Nuestro laboratorio ha propuesto la formación de un yodolípido conocido como 6-yodolactona (6-IL) que se deriva de la yodación del ácido araquidónico (AA). Este yodolípido tiene un potente efecto antineoplásico en diversos tipos celulares normales y cancerosos y se ha detectado su presencia en tumores mamarios de ratas suplementadas crónicamente con I_2 . También se ha mostrado que la 6-IL se une de manera específica y con gran afinidad a los receptores PPAR. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores nucleares y aunque en un principio se relacionaban al metabolismo de lípidos, ahora se conoce que también participan en numerosos procesos tanto fisiológicos como de carcinogénesis. Se han descrito tres isoformas de PPARs: PPAR α , PPAR β/δ , y PPAR γ . Estos receptores son codificados por genes independientes, su expresión en tejidos es diversa y en general se asocia a los PPAR α y PPAR β/δ a procesos de proliferación mientras que a los PPAR γ a diferenciación y apoptosis.

Este trabajo demuestra mediante técnicas de sobreexpresión y silenciamiento, que el efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL está mediado por la activación de los receptores PPAR γ . Estos estudios permiten proponer al yodo molecular como un elemento adyuvante en el tratamiento de cáncer mamario humano. Sus efectos antiproliferativos y diferenciadores sugieren su posible utilidad incluso en procesos cancerosos avanzados.

MARCO TEÓRICO

Glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula exocrina que se presenta de manera exclusiva en los mamíferos, forma parte del aparato reproductor femenino y mediante la síntesis y secreción de distintos elementos, nutre y protege en sus primeras etapas a los neonatos. Morfofuncionalmente está constituida por dos componentes: el parénquima (representado por su epitelio secretor y por el sistema de conductos) y el estroma (constituido por cúmulos de tejido adiposo, septos y ligamentos de tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y vasos linfáticos, además de filetes nerviosos que reciben los estímulos periféricos y otros que controlan la inervación autónoma del epitelio). Su componente epitelial proviene embriológicamente del ectodermo, mientras que su estroma se origina del mesodermo, aunque su desarrollo obedece a una inducción recíproca y remodelación conjunta. El desarrollo del tejido mamario es multi-etapas; en su fase embrionaria el tejido epitelial prolifera hacia el mesénquima en forma de un brote, seguidamente se ramifica formando un sistema de conductos rudimentarios el cual detiene su proliferación y se mantiene quiescente a partir del nacimiento. En la pubertad, la proliferación y elongación del árbol ductal se vuelve a activar bajo la inducción de hormonas sexuales, pero no es sino hasta el embarazo y la posterior lactancia, que se diferencia completamente formando estructuras alveolares y transformándose en un órgano lacto-secretor. Es importante resaltar que este órgano tiene la capacidad de regresar a un estado inactivo después de la lactancia y puede ingresar a un ciclo de expansión y regresión durante posteriores embarazos en la vida reproductiva de la mujer. Su función concluye al entrar a un estado de involución en la etapa post-menopáusica (Fig. 1) (Hassiotou & Geddes 2013; Inman et al. 2015).

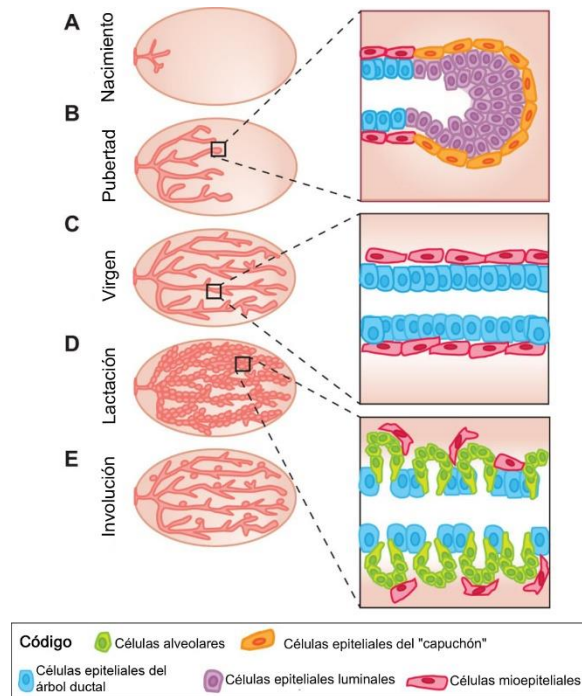


Figura 1. Desarrollo multi-etapas de la glándula mamaria. **A.** El análogo mamario ya está presente en el nacimiento y permanece quiescente hasta la pubertad. **B.** Bajo el influjo de hormonas sexuales se activa la proliferación y ramificación del árbol ductal hacia el estroma mamario, guiado por los brotes terminales estratificados (TEB, por sus siglas en inglés). En roedores, los TEBs tienen células “capuchón” que las rodean. **C.** La glándula mamaria vírgen está constituida principalmente por un sistema de conductos con células internas luminales y externas mioepiteliales, así como lobulillos inactivos. **D.** En el embarazo hay una expansión y diferenciación de células alveolares a partir de las zonas luminales (se ha propuesto que es a partir de células madre progenitoras presentes a intervalos regulares sobre la longitud del árbol ductal), los nuevos alveolos ocupan casi la totalidad de los cojinetes adiposos del estroma. **E.** Al término de la lactancia se desarrolla un estado de involución y reconfiguración de la matriz extracelular y la glándula mamaria ingresa a un estado de reposo (modificado de Inman et al. 2015).

Desde el punto de vista histológico, el parénquima epitelial mamario está dividido en dos poblaciones: el epitelio secretor y el epitelio ductal, ambos están rodeados por una tercera población de células denominadas mioepiteliales. Estas células junto con el músculo liso que rodea a los conductos galactóforos están encargadas de la expulsión de la secreción láctea proveniente de los alvéolos. El mantenimiento del tejido epitelial mamario, su proceso de diferenciación puberal, así como el ingreso a los ciclos de expansión y regresión está controlado por

células madre mamarias y sus progenitoras, las cuales al parecer se encuentran insertadas en distintos nichos de todo el sistema alveolo-ductal (Hassiotou & Geddes 2013; Inman et al. 2015).

Cáncer mamario

El cáncer de mama (CaM) es un término genérico el cual se refiere a un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que afectan a la glándula mamaria en su conjunto, tanto a su tejido epitelial como al estroma. De éstas, aquellas que se derivan del epitelio o también denominadas carcinomas mamarios (en realidad, adenocarcinomas por su origen glandular), son las más frecuentes constituyendo alrededor del 95%. Los carcinomas mamarios tienen distintas variantes clínico-patológicas, y actualmente se están reclasificando hacia variantes moleculares (discutidas más adelante) debido a que se ha demostrado que tienen un comportamiento biológico y respuesta diferencial al tratamiento (Kumar et al. 2015).

Al igual que en otras zonas anatómicas, la evidencia actual apunta a que existen lesiones predecesoras de las formas invasivas de cáncer mamario. Entre ellas las más importantes son el carcinoma ductal *in situ* y el carcinoma lobular *in situ* (DCIS y LCIS respectivamente, por sus siglas en inglés). Es importante mencionarlos ya que gracias a los sistemas de monitoreo por mastografía en los sistemas de salud pública en distintos países, la identificación de estas lesiones se ha mejorado y actualmente representan cerca del 30% de los carcinomas mamarios (EUA y Reino Unido), en México lamentablemente representan menos del 2% (Mohar et al. 2015). Los caracteriza la particularidad histológica de conservar íntegra la membrana basal del epitelio afectado y su perfil molecular es semejante al de los carcinomas invasivos. Sin embargo, tienen un comportamiento biológico bastante benévolo, su respuesta al tratamiento quirúrgico y por fármacos es bastante exitoso; el restante 70% de las lesiones malignas de mama lo integran los carcinomas invasivos. La clasificación actual de la OMS (Lakhani et al. 2012) considera dos grandes grupos: el carcinoma invasivo de “tipo no especial” (NST,

por sus siglas en inglés) y los subtipos especiales. El carcinoma NST es la variante más frecuente de cáncer mamario (~70%), y anteriormente fue conocido como “ductal” o “lobular”, esto fue empleado para intentar establecer subgrupos tanto de carcinomas *in situ* como invasivos, en base a su aspecto histológico y a partir de su probable origen. Sin embargo, actualmente todo apunta a que todos los carcinomas de mama provienen de la unidad lóbulo-ductal terminal (Kumar et al. 2015). Los subtipos especiales (~30%) son descritos separadamente ya que desde el punto de vista molecular, microscópico y de respuesta al tratamiento difieren de los carcinomas NST y están representados por los tipos lobular, mucinoso, tubular, papilar, micropapilar, apócrino, medular, secretorio e inflamatorio, por mencionar los más característicos y relativamente frecuentes de este subgrupo. Pero lo más relevante hoy en día es que las características moleculares de los carcinomas invasivos, determinan de manera importante los protocolos de tratamiento y el pronóstico de los mismos.

Se reconocen en este momento, tres subtipos moleculares (Lakhani et al. 2012; Kumar et al. 2015):

1. **Receptor de estrógenos positivo/HER2-negativo (ER+/HER2-)**. También se le denomina “luminal”, ocupa el 50% - 65% de los cánceres mamarios a nivel mundial, en México representa el 58% (Mohar et al. 2015). Éste a su vez se divide en dos subgrupos dependiendo de su índice de proliferación.
 - a. ER+/HER2- de baja proliferación (40% - 55% de los cánceres mamarios). Son los más frecuentes en poblaciones adultas mayores, se detectan generalmente en estadios tempranos, tienen baja recurrencia local y son generalmente curados con cirugía. Si dan metástasis lo hacen en períodos mayores a 6 años y generalmente a hueso. Responden bien a terapia hormonal y la supervivencia generalmente es buena (>50% a 5 años). Su firma génica está dominada por genes que responden al receptor de estrógenos.

- b. ER+/HER2- de alta proliferación (10% de los cánceres mamarios). A pesar de que son ER+ su expresión es baja y la positividad para receptor de progesterona es en la mayoría de los casos también baja o incluso ausente. Su huella génica es semejante a los arriba descritos, sin embargo hay una expresión elevada de genes asociados a proliferación. Un 10% de estos cánceres tienen una respuesta completa a la quimioterapia.
2. **HER2-positivo.** Representan cerca del 20% de los cánceres mamarios, en México representa el 22% (Mohar et al. 2015), la mitad de ellos pueden ser ER+, aunque su expresión es baja y la positividad para receptor de progesterona suele ser ausente. Este tipo de cáncer mamario se presenta en mujeres jóvenes, pueden dar metástasis cuando tienen un tamaño reducido y lo hacen particularmente a vísceras o cerebro. La terapia actual dirigida contra la actividad de HER2 mediante anticuerpos (p. ej. trastuzumab), ha mejorado de manera sustancial el pronóstico de las mujeres que los padecen; aunque desafortunadamente existe un subgrupo que genera resistencia, los mecanismos por los que lo hace son diversos.
3. **ER-negativo/HER2-negativo.** También se le conoce como tipo basaloide o “triple negativo”, pues también es negativo a receptor de progesterona, se presenta en cerca del 15% de los casos, en México es alrededor del 17% (Mohar et al. 2015). Tiene una alta proliferación y pueden dar metástasis aun cuando su tamaño sea reducido (vísceras y cerebro). Se observan en mujeres jóvenes pre-menopáusicas, 30% de los casos responden de manera completa a la quimioterapia, pero aquellas que tienen recurrencia lo hacen dentro de los 5 años después del tratamiento, la supervivencia es baja cuando esto sucede.

Desde el punto de vista clínico (y dependiendo de la Institución) a los carcinomas invasivos se les puede asignar un grado histológico denominado “Grado Histológico de Nottingham” (Elston & Ellis 1991; Frkovic-Grazio & Bracko

2002; Rakha et al. 2008). Esta “gradación” está basada (de manera subjetiva por la interpretación del patólogo) en la formación de estructuras tubulares, pleomorfismo nuclear y tasa de proliferación mitótica, asignando un valor mínimo de 1 (“bueno”) y máximo de 3 (“malo”) por cada parámetro, resultando una puntuación mínima de 3 y máxima de 9 para el conjunto de los parámetros. Se asignan 3 categorías:

- **Grado I (bien diferenciado, 3, 4 o 5 puntos).** Los carcinomas crecen con un patrón tubular, con un núcleo redondo y pequeño y tienen un bajo índice de proliferación.
- **Grado II (moderadamente diferenciado, 6 o 7 puntos).** Los carcinomas presentan cúmulos de nidos sólidos, algunas estructuras tubulares, así como focos de células individuales infiltrantes; hay un grado mayor de pleomorfismo nuclear y se pueden observar figuras mitóticas.
- **Grado III (pobrementemente diferenciado, 8 o 9 puntos).** Los carcinomas infiltran en forma de nidos, láminas y células individuales, hay escasa o ausente formación de estructuras tubulares. El pleomorfismo nuclear es franco, el rango de proliferación es alto y es común observar zonas de necrosis.

La asignación de este grado histológico, tiene por objeto servir como factor pronóstico o en otras palabras determinar la agresividad del tumor, no determina las decisiones terapéuticas, pero ha demostrado predecir con relativa seguridad el comportamiento del CaM (Frkovic-Grazio & Bracko 2002; Rakha et al. 2008).

Epidemiología del cáncer mamario en México

Se calcula que la incidencia anual por CaM en México es de 28 mujeres por cada 100,000, sin embargo si lo vemos por grupos de edad la incidencia se dispara a partir de los 45 años (52/100,000) siendo el grupo de 60 – 64 años en el que se concentra la mayor cantidad de casos nuevos (68/100,000) (INEGI 2015).

En términos generales anualmente se diagnostican en México alrededor de 16,000 casos nuevos y para el 2020 serán por arriba de 16,500 (Knaul et al. 2009). Las muertes por esta enfermedad son de alrededor de 6,000 casos anuales (1 muerte por cada hora y media), y representan la primer causa de muerte por tumores malignos que afectan a la mujer (Rizo-Ríos et al. 2015), de hecho los tumores malignos ocupan la segunda causa de muerte en México desde el año 2000 (Sosa-Durán & García-Rodríguez 2013; Rizo-Ríos et al. 2015), aunque las cifras oficiales para el año 2015 ubican al CaM en 4° lugar como causa de muerte por tumores malignos en la población general y el 2° en los casos de decesos por tumores malignos en mujeres (INEGI 2015).

La tasa de mortalidad ($\sim 9.4/10^5$) (Rizo-Ríos et al. 2015) se debe en gran medida a que el 70% de los casos de CaM en México, se diagnostican en etapas avanzadas (Mohar et al. 2015). En este sentido, se observa una incidencia conjunta en el grupo de edad de 50 a 74 años, de 535/100,000 mujeres que ingresan a los servicios de salud por motivos relacionados a CaM (INEGI 2015), siendo en muchos de los casos cuando se diagnostica la enfermedad, como se había mencionado anteriormente (grupo de 60-64 años). Sin embargo y aunque parezca contradictorio, la edad promedio al morir se ha mantenido entre los 57-59 años (Knaul et al. 2009; Vara-Salazar et al. 2011), el porqué de este comportamiento en nuestro país, es verdaderamente complejo, pero tiene que ver mucho con acceso a los sistemas de salud, carencias de infraestructura para el tamizaje y por supuesto al tratamiento (Vara-Salazar et al. 2011). El tipo histológico mayormente diagnosticado es el tipo ductal (canalicular o NST) con 84% de los casos, seguido del lobulillar con 9.6%, menos del 2% corresponde a casos de carcinoma *in situ* y el porcentaje restante está integrado por variantes especiales (Mohar et al. 2015).

Factores de riesgo

Existen ciertas condiciones intrínsecas y extrínsecas al cuerpo humano que favorecen el desarrollo de cáncer mamario (CaM). Se ha demostrado que algunas

de ellas juegan un papel determinante, mientras otras aún son estudiadas para demostrar su probable impacto inductor. A continuación se enlistan los distintos factores de riesgo (Kumar et al. 2015):

- **Mutaciones en la línea germinal.** Del 5 al 10 % de los casos de CaM presentan mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, a su vez los pacientes afectados tienen un riesgo de desarrollar CaM del 90% a lo largo de su vida.
- **Familiares de primera línea (madres, hermanas o hijas) afectadas por CaM.** Cerca del 15 al 20% de las mujeres afectadas por CaM tienen una familiar de primera línea sufriendo de CaM. Si bien no presentan una mutación genética identificable, es altamente probable que se asocie a genes susceptibles de bajo riesgo y a que compartan factores ambientales inductores. Es importante destacar que este riesgo se atenúa considerablemente cuando la familiar afectada es una mujer postmenopáusica.
- **Raza/Etnicidad.** Las mujeres blancas en Estados Unidos y Europa tienen un alto riesgo de padecer CaM, mientras que las poblaciones denominadas latinas (por ejemplo México) ocupan cerca del tercer lugar.
- **Edad.** La década de vida con mayor incidencia de CaM es la octava (de los 70 a los 79 años de edad) a nivel mundial; sin embargo, en México la prevalencia es en mujeres de alrededor de los 60-64 años de edad (INEGI 2015).
- **Menarca temprana.** Presentar una menarca antes de los 11 años eleva el riesgo de desarrollar CaM en 20% comparado con aquellas mujeres que la presentan después de los 14 años de edad.
- **Menopausia tardía.** Desarrollar menopausia después de los 45 años de edad incrementa el riesgo de desarrollar CaM.

- **Edad del primer embarazo (nacido vivo).** Aquellas mujeres que tienen hijos por debajo de los 20 años disminuyen a la mitad el riesgo de padecer CaM comparado con aquellas mujeres que tienen embarazos a término después de los 35 años.
- **Enfermedad mamaria benigna.** El diagnóstico (por biopsia) de cambios proliferativos o hiperplasia atípica eleva la posibilidad de que haya transformación a neoplasia maligna invasiva.
- **Exposición a estrógenos.** La terapia de sustitución hormonal para pacientes menopáusicas aumenta el riesgo de desarrollar CaM, particularmente cuando se dan por un periodo de años, estrógenos y progestina de manera combinada. En contraste, parece que los anticonceptivos orales no provocan ésta inducción. En este sentido, la reducción de estrógenos endógenos por procedimientos quirúrgicos como la ooforectomía bilateral, reduce el riesgo de desarrollar cáncer en un 75%. Y de manera similar (aunque aún controversial) el bloqueo de su acción (p.ej. tamoxifeno) o de su síntesis (inhibidores de la aromatasa) también disminuye el riesgo de sufrir CaM ER+ (Kumar et al. 2015).
- **Densidad mamaria.** Se refiere a la densidad (radiopacidad o distintas tonalidades de gris) del patrón radiográfico que se observa en las mastografías. Las mujeres con un patrón de densidad elevado tienen entre 4 y 6 veces más riesgo de presentar CaM, además también se correlaciona con otros factores de riesgo como edad avanzada, primer embarazo, pocos hijos o terapia de sustitución hormonal.
- **Exposición a fuentes de radiación.** Mujeres que son sometidas a radioterapia por linfoma de Hodgkin tienen un 20-30% de más posibilidades de desarrollar CaM dentro de los 30 años subsiguientes (mujeres adultas sometidas a esta modalidad de tratamiento no presentan dicho riesgo), la

fuentes de radiación incluye accidentes nucleares y mujeres aledañas a los sitios de Hiroshima y Nagasaki.

- **Carcinoma de mama contralateral o de endometrio.** 1% de las mujeres con CaM, desarrollarán CaM del lado contralateral o del revestimiento endometrial, se ha postulado que la exposición prolongada a estrógenos puede ser el factor inductor.
- **Obesidad.** Las mujeres obesas postmenopáusicas presentan un mayor riesgo, el cual se atribuye a la síntesis de estrógenos en los depósitos de grasa.
- **Tabaquismo.** La evidencia actual sugiere que puede existir un potencial efecto causal en las mujeres fumadoras y el CaM, particularmente en aquellas con un hábito intenso, así como con un inicio temprano del mismo (Reynolds 2013). Se ha descrito la capacidad carcinogénica de varios componentes del cigarro en modelos mamarios y estudios recientes evalúan el posible papel modificador de polimorfismos involucrados en el metabolismo del tabaco, como NAT2 (Reynolds 2013) y alteraciones a nivel transcripcional (Pérez-Solis et al. 2016).

De todos los arriba mencionados, los factores de riesgo con mayor peso para el desarrollo de CaM son definitivamente las mutaciones en la línea germinal (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*), exposición prolongada a estrógenos (terapia de sustitución hormonal) y los factores endocrino/reproductivos (Aceves et al. 2005; Anguiano & Aceves 2011).

Factores de protección (la dieta, ingesta de yodo)

Al igual que existen condiciones que elevan la probabilidad de desarrollar CaM, también existen ciertas circunstancias igualmente intrínsecas y extrínsecas que protegen a la mujer de desarrollarlo. Algunas de ellas son antagónicas, como por ejemplo los factores reproductivos, la dieta o el estilo de vida. Entre los

factores que se han asociado a protección se encuentran (Kumar et al. 2015; Inumaru et al. 2011):

- **Obesidad.** En las mujeres menores de 40 años, la obesidad provoca ciclos anovulatorios, los cuales disminuyen de manera sustancial la producción de progesterona.
- **Amamantamiento prolongado.** La lactación suprime la ovulación y activa la diferenciación terminal de las células luminales. En países en desarrollo la lactancia es más prolongada (asociada también a la multiparidad) y algunos autores han asociado esta característica con bajas incidencias de CaM.
- **Multiparidad.** Con el fundamento de diferenciación celular por la lactación, ciclos repetidos de diferenciación terminal se cree que pueden proteger a las mujeres de desarrollar CaM.
- **Estilo de vida.** Si bien hay pocos estudios al respecto, se considera que las mujeres físicamente activas tienden a presentar menos CaM.
- **Dieta.** Hemos dejado al final este posible factor protector para dedicarle una mayor contextualización, puesto que el desarrollo de este trabajo está fundamentado en la ingesta y participación bioquímica de un oligoelemento esencial en la dieta humana, el yodo. Ya se abordó de manera muy general las características del CaM, pero es prudente en este momento llamar la atención en cuanto al comportamiento de esta enfermedad en dos tipos de poblaciones, la occidental y la oriental-asiática, particularmente la japonesa. Desde hace tiempo se ha notado que los países occidentales (Europa y Norteamérica) tienen una incidencia alta de CaM comparada con la población oriental, por ejemplo para el año 2012 (los datos disponibles más recientes para el primer trimestre de 2016 comparable entre naciones) EUA tuvo una incidencia (ajustada por edad) de 124.9 mujeres afectadas por 100,000 (Howlader et al. 2015) y el Reino Unido de 129.2/100,000 (Ferlay

et al. 2013), mientras que Japón tuvo 51.5/100,000 o Corea del Sur 52.1/100,000 para el mismo año (Youliden et al. 2014), es importante señalar que los datos son comparables ya que sus registros son confiables de acuerdo a la *International Agency for Research on Cancer* (Ferlay et al. 2014), en el que EUA tiene una categoría A1, Reino Unido A1, Japón B1 y Corea del Sur A2, categorías dadas de acuerdo al acceso a la información y el registro sistemático de los datos de salud de su población. Aunque la diferencia entre ambas naciones se está modificando (disminuyendo para EUA e incrementándose para Japón) (Saika & Sobue 2009), la diferencia sigue siendo sustancial. Surge por supuesto, el cuestionamiento de que esta diferencia pueda tener un fondo racial, al respecto un estudio hecho por Maskarenic y Noh (Maskarinec & Noh 2004), ha mostrado que la migración de japoneses hacia Hawaii incrementa el riesgo de desarrollar CaM desde la primera generación (Fig. 2) y el riesgo se incrementa en 3 veces para la segunda generación. Este estudio, descarta un fondo racial y apoya la idea de que un componente en el estilo de vida, ya sea su ausencia, su nueva presencia, o una combinación de ambos incrementa la posibilidad de desarrollar CaM, otros estudios han mostrado resultados similares (Ziegler et al. 1993). En este sentido, la dieta asiático-oriental está dominada por alimentos provenientes del mar, entre ellos las algas marinas, esta fuente de alimento contiene altas cantidades de yodo, el cual se encuentra en diversas formas químicas (I^- , I_2 , yodato: IO_3^-), el consumo promedio de yodo en la población japonesa es de 1,200-5,000 $\mu\text{g}/\text{día}$ comparado con los 166 o 209 $\mu\text{g}/\text{día}$ que consumen las poblaciones del Reino Unido y EUA, respectivamente (Cann et al. 2000; Miller 2006; Teas et al. 2004; Nagataki 2008; Zava & Zava 2011). El posible papel del yodo como factor protector para las poblaciones asiáticas-orientales ha sido planteado apenas a inicios de la década pasada (Cann et al. 2000). Un abordaje más amplio acerca de este bioelemento, sus mecanismos de

acción y su papel como posible compuesto terapéutico, será abordado en las siguientes secciones.

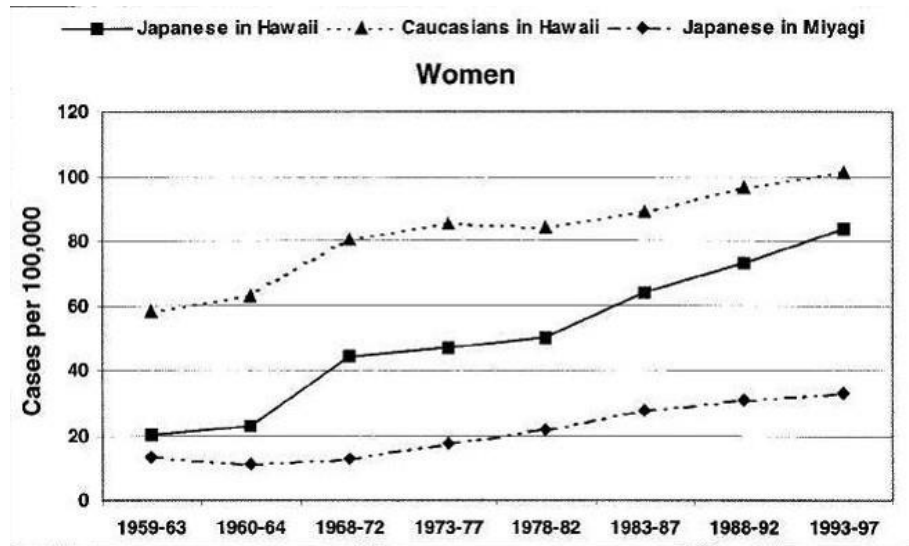


Figura 2. Efecto de la migración de poblaciones humanas sobre la incidencia de CaM. Se puede observar en la gráfica el seguimiento por cerca de 40 años de tres poblaciones: japonesas que han migrado a Hawaii, así como sus descendientes (2 generaciones), caucásicas también residentes de Hawaii y japonesas residentes de la ciudad de Miyagi, Japón. Se puede notar que en el primer punto de medición, la incidencia es baja en ambos grupos de japonesas con respecto a las caucásicas, sin embargo la incidencia se incrementa y empieza a comportarse de manera semejante en las japonesas y sus descendientes que han migrado a Hawaii con respecto a la población caucásica residente en Hawaii, mientras que las japonesas residentes en Miyagi continúan presentando incidencias de CaM bajas (tomado de Maskarinec & Noh 2004).

Yodo

Captación. El yodo en forma de yoduro (I^-) ingresa a las células a través de la membrana basal gracias a una glicoproteína transportadora conocida como cotransportador de sodio-yoduro (NIS, Na^+/I^- symporter). Su función la ejerce mediante la traslocación simultánea de dos átomos de Na^+ (a favor de su gradiente) y uno de I^- (en contra de su gradiente). La fuerza electromotriz que necesita NIS está dada por el gradiente de concentración de Na^+ , un gradiente dirigido hacia el interior de la célula generado por la ATPasa Na^+/K^+ (Carrasco 1993). Se ha demostrado su presencia en numerosos tejidos extratiroideos como glándula mamaria lactante, glándulas salivales, plexos coroideos y mucosa

gástrica; además de NIS se conoce la existencia de un segundo transportador de yoduro conocido como PDS o Pendrina, se trata de un intercambiador de aniones, su localización es en el dominio apical de los tirocitos, y su función es expulsar el I^- hacia el lumen de los folículos tiroideos, su presencia también se ha demostrado en el dominio basal de células cancerosas tanto de tiroides como de mama (Rillema & Hill 2003a; 2003b). Un tercer transportador de reciente descripción es el transportador de yoduro apical humano (hAIT, human apical iodide transporter), el cual se encuentra en el dominio apical de tirocitos y tiene una función similar a la de PDS que es expulsar el I^- al lumen folicular tiroideo (Lacroix 2004). Los transportadores antes descritos están involucrados en la internalización del yodo en la forma química de yoduro (I^-), sin embargo, el proceso para incorporar yodo molecular (I_2) aún no está del todo descrito. Los pocos estudios que analizan la captación de I_2 por sistemas vivos son los realizados en algas marinas pardas del género *Laminaria*. En este estudio mostraron que el I^- presente en el agua de mar es oxidado por la exoenzima haloperoxidasa convirtiéndolo a I_2 ó ácido hipoyodoso para entonces ser internalizado por un sistema de difusión facilitada (Küpper et al. 1998). Nuestro grupo ha demostrado que el I_2 es captado por las células neoplásicas de origen mamario (MCF-7) por medio de un mecanismo de difusión facilitada saturable y dependiente de síntesis de proteínas, pero independiente de NIS, PDS, Na^+ y energía sugiriendo la existencia de un transportador similar al de las algas (Arroyo-Helguera et al. 2006).

Organificación. El yodo es capaz de incorporarse a proteínas (yodotironinas) y a lípidos (yodolípidos). Cuando está en forma de yoduro debe ser oxidado por una peroxidasa, la cual reduce el yoduro a diversas especies oxidadas del yodo como: yodonio (I^+), yodo radical libre (I^0), hipoyodito (IO^-), ácido hipoyodoso (HIO), y yodo molecular (I_2). Aunque no se ha determinado con exactitud qué forma de yodo se une a la tiroglobulina (en el caso de la tiroides) para formar las tironinas y cual a los lípidos, se postula que las formas hidrofóbicas pueden reaccionar primordialmente con los ácidos grasos de cadena larga dando lugar a la formación de lípidos yodados. Este proceso conocido como

yodolactonización está restringido a los ácidos carboxílicos insaturados β - γ , γ - δ y δ - ε de los ácidos araquidónico, eicosapentanoico y docosahexanoico (Ha et al. 2000; Nava-Villalba & Aceves 2014).

Transformación de ácido araquidónico (AA) a 6-yodolactona (6-IL, 5-hidroxi-6-yodo-8-11-14-eicosatrienoico- δ -lactona)

El ácido araquidónico es un ácido graso poli-insaturado con cuatro dobles enlaces y se localiza en la membrana celular formando parte de los fosfolípidos. Para que éste se encuentre disponible se requiere que su enlace éster, que lo une al residuo de glicerol, sea hidrolizado. Esta acción es realizada principalmente por la fosfolipasa A₂, de esta forma con el ácido araquidónico libre, el I₂ es capaz de atacar el doble enlace que se encuentra en el C⁶-C⁵ y C¹⁴-C¹⁵ de esta molécula, y generar un cambio esteroespacial con la formación de un anillo lactona (Fig. 3) (Monteagudo et al. 1990; Boeynaems & Hubbard 1980; Turk et al. 1983).

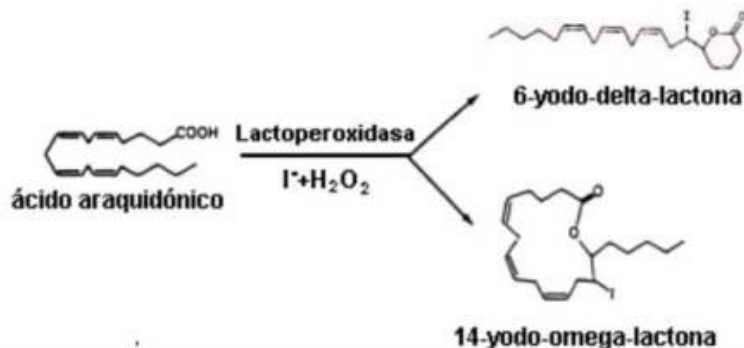


Figura 3. Formación de 6-yodolactona y 14-yodolactona. A partir de la oxidación del yodo por una peroxidasa se puede llevar a cabo la lactonización del ácido araquidónico (Monteagudo et al. 1990). Si bien esto también ocurre con yodo molecular.

Cabe resaltar, que aunque teóricamente la yodación del ácido araquidónico se puede realizar en cualquiera de los cuatro dobles enlaces, los productos más abundantes son la 6-IL y la 14-IL (Turk et al. 1983).

Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs, Peroxisomal Proliferators-Activated Receptors)

Los PPARs son factores de transcripción activados por ligando y pertenecen a la familia de receptores nucleares. Fueron descritos en ranas *Xenopus* y en roedores a inicios de la década de los 90's como receptores huérfanos, pero eran capaces de ser activados por compuestos que inducen la proliferación de peroxisomas (Issemann & Green 1990; Dreyer et al. 1992). Estos últimos, son organelos citoplasmáticos limitados por una membrana, en su interior contienen una gran variedad de enzimas (oxidadasas y catalasas) y entre sus funciones principales está el metabolismo lipídico y la detoxificación de la célula. Actualmente se conocen tres miembros de estos receptores, que son codificados por diferentes genes: PPAR α , PPAR β/δ , y PPAR γ (Kota et al. 2005). Para llevar a cabo su función deben unirse a su ligando, esto permite su heterodimerización con el receptor de ácido retinoico tipo X (RXR) y su translocación al núcleo en donde se unen junto con otros cofactores a elementos de respuesta a PPAR (PPRE) de genes blanco (Fig. 4). También se han descrito activaciones no dependientes del reconocimiento de la secuencia PPRE, donde el complejo PPAR/RXR es capaz de reclutar coactivadores que tienen actividad de acetilación de histonas y esto permite la transcripción de genes que, como se mencionaba, no contienen el PPRE (Berger & Moller 2002).

Los ligandos endógenos conocidos para los PPARs son principalmente ácidos grasos de cadena larga. Se sabe que los ácidos grasos poli-insaturados activan a las tres isoformas de PPAR con relativamente baja afinidad, mientras los derivados de estos muestran mayor selectividad en la unión (Krey et al. 1997) por lo que se consideran los verdaderos ligandos endógenos.

La distribución de la familia PPAR en tejidos es diferencial, la isoforma alfa se encuentra principalmente en hígado e intestino. La isoforma beta es ubicua y la isoforma gama se localiza principalmente en tejido graso y bazo (Ehrmann et al.

2002). Las tres isoformas han sido identificadas en la glándula mamaria de roedores tanto normal como tumoral (Gimble et al. 1998; Roberts-Thomson & Snyderwine 2000; Suchanek et al. 2002), así como en humanos (Suchanek, et al. 2002; Nunez-Anita et al. 2011) y su papel en el CaM se discutirá a continuación.

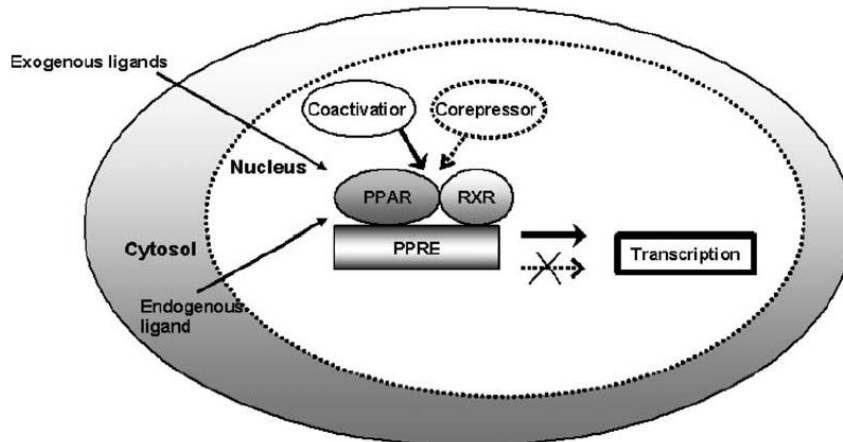


Figura 4. Mecanismo de transcripción génica de los PPARs. Los PPARs inactivos están unidos a un complejo represor. Una vez que hay unión con los ligandos exógenos (fármacos) o endógenos (ácidos grasos, prostaglandinas, etc.), los PPAR se heterodimerizan con los RXR y se unen a elementos de respuesta a PPAR (PPRE) iniciando la transcripción o represión de dicho gen (Kota et al. 2005).

Asociación de PPARs y cáncer, participación en neoplasias malignas de mama

Se ha relacionado a los PPARs en el control de la proliferación de diferentes tipos de cáncer (Michalik et al. 2004). En términos generales la isoforma alfa y beta/delta han sido relacionadas con proliferación celular, mientras que ocurre lo contrario con la isoforma gama la cual favorece procesos de diferenciación y apoptosis (Kersten et al. 2000; Wang et al. 2003; Han et al. 2004). En diversas líneas celulares de cáncer mamario como MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435, BT474, y T47D, se ha demostrado la inducción de apoptosis, arresto celular, y prevención de carcinogénesis por distintos ligandos endógenos o sintéticos de PPAR γ (Elstner et al. 1998; Mehta et al. 2000; Yin et al. 2001; Maggiora et al. 2004; Bocca et al. 2007). Las vías que regulan dichos efectos

antiproliferativos están mediadas por la disminución en la expresión de ciclina D1, CDK2, CDK4, CDK6, PCNA, y por un aumento en la expresión de p21 o activación de la vía E-Caderina/ β -catenina. Además de estos efectos en la proliferación también se ha observado un efecto angiostático (Xin et al. 1999), permitiendo proponer que podría prevenir de esta manera el desarrollo de metástasis.

Los hallazgos sobre la inhibición de la proliferación inducida por ligandos de PPAR γ en estudios *in vitro* se ve reforzada por la evidencia obtenida en estudios *in vivo*. En el caso de tumores inducidos por carcinogénicos como el dimetil-benzantraceno (DMBA) o el *N*-metil-*N*-nitrosourea (MNU), el tratamiento con ligandos sintéticos como la troglitazona o el GW845 inhibe el crecimiento tumoral pero no evita su aparición (Pighetti et al. 2001). En otros se ha reportado además de la reducción en el tamaño de la masa tumoral, también el retraso en la aparición de nuevos tumores (Suh et al. 1999; Yin et al. 2005). En otra línea de pensamiento, se ha sugerido que el efecto anticancerígeno de PPAR γ puede ejercerse a través de la inhibición de COX-2 (Badawi et al. 2004), esta enzima es responsable de la síntesis de prostaglandinas, las cuales se han reportado estar aumentadas en pacientes que presentan metástasis (Rolland et al. 1980a; 1980b). El tratamiento con ligandos de PPAR γ aunado con el empleo de inhibidores de COX-2 tiene un efecto sinérgico al disminuir la formación de tumores (Badawi et al. 2004; Mustafa & Kruger 2008).

Finalmente, se ha demostrado que PPAR γ puede inducir la re-diferenciación en células de cáncer mamario (Mueller et al. 1998), cambiando su patrón de expresión génica, provocando la acumulación de lípidos y desarrollando un fenotipo celular menos agresivo. Una mayor expresión de los PPAR γ medido por inmunohistoquímica en tumores humanos, se correlaciona con un mejor pronóstico en cáncer mamario humano (Papadaki et al. 2005).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Numerosos estudios ha demostrado que el suplemento crónico y moderadamente elevado (miligramos) de yodo molecular ejerce efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y apoptóticos tanto en patologías benignas (fibrosis, hiperplasia) como cancerosas en tejidos tiroideo, mamario y prostático (Ghent et al. 1993; Eskin et al. 1995; Kessler 2004; García-Solís et al. 2005; Arroyo-Helguera et al. 2006; Vega-Riveroll et al. 2010; Anguiano & Aceves 2011; Aranda et al. 2013; Olvera-Caltzontzin et al. 2013). Los componentes celulares y moleculares que median dicha respuesta no se conocen a profundidad. Se ha postulado que la molécula efectora, por lo menos en tirocitos, tanto de cerdo como de humano, puede ser la 6-yodolactona, que como ya se había comentado se deriva de la yodación del ácido araquidónico (AA) (Boeynaems & Hubbard 1980; Dugrillon et al. 1990; Dugrillon et al. 1994). Nuestro grupo ha detectado a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (*HPLC*, por sus siglas en inglés) la presencia de esta yodolactona en tumores mamarios de ratas suplementadas crónicamente con I₂ (Arroyo-Helguera et al. 2008). Sin embargo la presencia de la 6-IL en las células tumorales y la participación de ésta en la activación o represión de los PPARs no está bien caracterizada.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El efecto antiproliferativo y apoptótico del I₂ está mediado por la generación de 6-IL, la cual activará a los receptores PPAR γ .

Objetivo general

Determinar la participación de la 6-IL y los PPAR γ en el efecto antiproliferativo del I₂ en células tumorales mamarias.

Objetivos específicos

- Identificar la presencia de 6-IL en líneas celulares mamarias normales y tumorales suplementadas con I₂.
- Caracterizar el efecto fisiológico de la unión de la 6-IL y los PPAR γ

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El medio de cultivo Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), el suero fetal bovino (SFB), soluciones de penicilina, estreptomycin y tripsina 0.05%-EDTA 0.2 g/L fueron obtenidas de GIBCO-BRL (Grand Island, NY). El ácido araquidónico (pureza 99%) se obtuvo de Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Las distintas sustancias químicas fueron de alto grado de pureza y disponibles comercialmente.

Cultivos celulares

La línea celular MCF-7 (células epiteliales neoplásicas mamarias) así como la línea celular MCF-12F (células epiteliales ductales de fenotipo normal inmortalizadas) se obtuvieron de ATCC[®] (HTB-22[™] y CRL-10783[™], respectivamente). Ambas líneas celulares fueron mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementadas con 10% (v/v) de FBS, 100 U/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin (medio basal). Los cultivos celulares fueron sembrados a una confluencia del 50-70% y mantenidos en una incubadora a 37°C con atmosfera de CO₂ al 5%, el medio fue reemplazado cada 2 días o diariamente según el tratamiento.

Identificación de 6-IL y su sustrato en células normales y tumorales, tratadas o no con I₂

Síntesis de 6-IL (5-hidroxi-6-iodo-8-11-14-eicosatrienoico- δ -lactona)

La 6-yodolactona (6-IL) fue sintetizada de la siguiente manera: (Sol. A) 156 mg de yodo elemental se disuelven con 8 ml de acetonitrilo anhidro agitando continuamente bajo atmósfera de N₂ en baño con hielo (5-10 min) y protegidos de la luz. Se disuelven 65 microlitros de ácido araquidónico $\geq 99\%$ (grado GC) (Sigma, USA, A-9673) en 0,8 ml de acetonitrilo (CH₃CN) y se agregan a la solución A. Se continúa en baño de hielo 5 minutos más, después se deja agitando protegido de la luz, a temperatura ambiente 4 horas más. Se agrega tiosulfato de sodio para clarificar (cantidad suficiente), volcando el contenido en 20 ml de agua destilada, se extrae 4-5 veces con diclorometano (20 ml) y se reúnen las fases orgánicas, se lava con un vol. de agua, se seca la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, dejando en frío (4 °C) al menos 10 horas, al final de este tiempo se filtra la suspensión, evaporando a sequedad con N₂. Se re-disuelve en 5 ml con diclorometano y se evapora hasta 0,5 ml con N₂, después se eluye en una columna de sílica gel (tamaño de la partícula, 230-400 mesh. 60 Å) con diclorometano (CH₂Cl₂), se toman 20 fracciones de 5 mL cada una y se siembra una alícuota de 5 μ L de cada una en una cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), se corre en diclorometano/metanol (97.5:2.5 mL) revelándola con yodo elemental.

El "rf" (Fig. 5) de la lactona es 0,82; se juntan las fracciones donde se encuentre la lactona se evaporan, se pesa, se vuelve a reconstituir y se fraccionan, secándose nuevamente para guardarla a -70°C. Modificaciones al trabajo de extracción: el producto crudo fue concentrado a 0.5 ml y separado a través de TLC preparativa, usando el sistema CH₂Cl₂/MeOH (97.5:2.5), se identifican las bandas que corresponden a cada producto se recuperan por raspado y se concentran con diclorometano (Fig. 6).

$$r_f = \frac{\text{Distancia que se desplazó la sustancia problema (Y)}}{\text{Distancia alcanzada por la fase móvil (X)}}$$

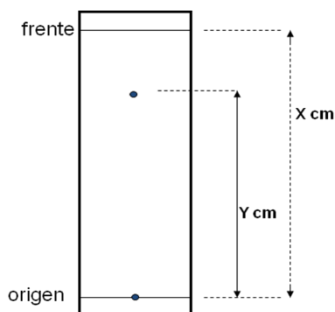


Figura 5. Fórmula para obtener el factor de retención de un compuesto (rf). Debe registrarse el límite en el que el frente de migración se detiene, posteriormente se retira el cromatofolio y se deja evaporar el eluyente, posteriormente se revela con vapores de yodo y se realizan las mediciones correspondientes del frente (X) y el compuesto de interés (Y), en este último la medición de ser hecha en el centro de la marca.

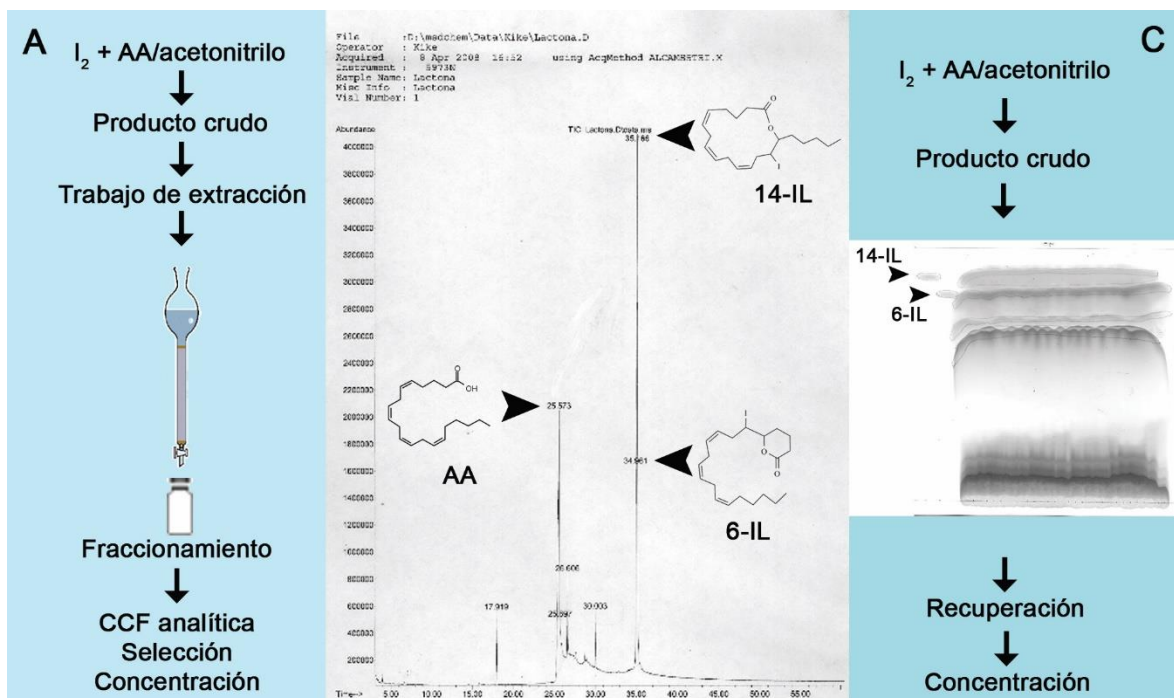


Figura 6. Esquemas comparativos entre el protocolo tradicional y modificaciones al protocolo. **A.** el producto crudo es sometido a un proceso de extracción, el cual comprende aclaramiento con tiosulfato de sodio, extracción con diclorometano, deshidratación con sulfato de sodio anhidro, (10 hrs), filtrado y concentración, fraccionamiento a través de cromatografía en columna con silica gel, identificación y recuperación. **B.** cromatograma de gases mostrando distintos picos (AA, 14-IL, 6-IL y otros compuestos no identificados) obtenidos del proceso de yodación del AA en A. **C.** el producto crudo es concentrado a 0.5 ml y separado por TLC preparativa usando el sistema eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97.5:2.5). Los estándares de 14-IL y 6-IL fueron visualizados con vapores de yodo, recuperados y concentrados.

Extracción de lípidos de cultivos celulares y metanólisis alcalina de extractos lipídicos para la obtención de AA total

Los cultivos celulares fueron recuperados mediante la adición de tripsina y el número de células se determinó empleando la cámara de Neubauer. Se agregó amortiguador de lisis (EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.0, sarcosil 0.8% w/v) incubándose durante 30 minutos, y se realizó la extracción de lípidos a través del método de Bligh-Dyer (Bligh & Dyer 1959). Los extractos fueron sometidos a saponificación añadiendo 2 mL de KOH metanólico e incubados a una temperatura de 80°C durante 60 min. Los ácidos grasos fueron extraídos 3 veces con 1 mL de hexano, evaporados a sequedad y reconstituyéndose en 300 µL de etanol absoluto, almacenándose a -70°C.

Identificación de AA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) en fase reversa

Se inyectaron 80 µL de cada muestra. La absorción se detectó a 206 nm con un detector ultravioleta y una columna Acclaim[®] 120 DIONEX C₁₈ (4.6 x 250 mm; tamaño de la partícula, 5 µm), a través de la cual se hizo pasar una elución isocrática de 1 mL/min, una fase móvil compuesta de la solución A 70% (CH₃CN/ácido fórmico al 0.1%), y de la solución B 30% (H₂O/ácido fórmico al 0.1%) durante 45 min. La curva estándar se construyó a concentraciones crecientes de AA (2-50 µM, $r^2=0.9901$). Se realizó un análisis de área bajo la curva, los resultados se expresaron como µmol de AA/número de células.

Extracción lipídica de células tratadas con I₂ para análisis en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, Gas Chromatography – Mass Spectrometry)

20X10⁶ células MCF-7 y MCF-12F fueron sometidas a extracción lipídica como se ha reportado previamente (Dugrillon et al. 1994) con ligeras modificaciones: las células fueron tratadas durante 1 hr con un inhibidor de ciclooxigenasa (COX) inespecífico, ibuprofeno 10 µM (BioMol International, Enzo

Life Sciences, NY, EUA) y un inhibidor de lipooxigenasa, ácido dihidroguaiarético (NDGA) 1 μM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Posteriormente fueron tratadas con 200 μM de I_2 durante 24 hrs. Las células se desprendieron con tripsina y resuspendieron en 2 ml de PBS (pH 7.4), se dejaron agitándose durante toda la noche con 4 ml de etanol:ácido acético (9:1 v/v). Los extractos fueron centrifugados (3000 rpm/30 min) y los lípidos se extrajeron del sobrenadante al agregar un volumen de cloroformo y un volumen de agua. La fase orgánica (inferior) fue evaporada a sequedad y resuspendida en 10 μL de cloroformo, se inyectaron 2 μL de cada muestra en el GC-MS.

Identificación de 6-IL y 14-IL por GC-MS

El monitoreo de los iones seleccionados fue realizado en un equipo GC/MS Hewlett Packard series II (Waldbronn, Alemania), la columna utilizada fue de tipo capilar de silica fundida 1% (HP-1, 25 m, 0.2 mm \varnothing , grosor de revestimiento 0.33 μm). El puerto de inyección se mantuvo a 250°C y la energía aplicada fue 70 eV. Las condiciones para GC fueron: temperatura del inyector 250°C, temperatura de interface 300°C, programa de temperatura del horno 2 min en 100°C, de 100 a 250°C en 30°C cada minuto, de 250 a 300°C en 5°C cada minuto, 5 min en 300°C. El gas eluyente fue helio (rango de flujo, 30 ml/min) y la presión de la columna fue de 5 psi. Para la espectrometría de masas se utilizó un detector selectivo de masa serie 5972 (Waldbronn, Alemania), operado a una energía de 70 eV. Se inyectaron 2 μL de estándar y muestras en modo “splitless” con un tiempo de purga de 5 min. El ion seleccionado para su monitoreo fue 303, debido a la pérdida del yodo (m/z 127) de la 6-IL (m/z 430). La identificación de 6-IL fue realizada al monitorear la presencia del ión 303 como se ha reportado previamente (Boeynaems & Hubbard 1980). El tiempo de retención de la 6-IL en GC fue de 26.59 min, tiempo en el que también se identificó el ion 303 en gran abundancia. El tiempo de retención de la 14-IL en GC fue de 24.36 min, tiempo en el que se identificó el ion 303 en menor abundancia.

Efecto de la 6-IL y la 14-IL sobre la proliferación de células MCF-7

Debido a que en la síntesis se detectaron dos compuestos lactona (14-IL y 6-IL) se evaluó el efecto antiproliferativo de la 14-IL en células MCF-7 o la combinación de ambas lactonas sobre estas células y determinar si los cambios eran semejantes al efecto de la 6-IL que previamente se había reportado (Arroyo-Helguera et al. 2008). La proliferación se evaluó mediante el ensayo de exclusión por azul de tripano, que consiste en la exclusión del conteo de células teñidas por el colorante y que evidencia permeabilidad de la membrana plasmática (considerándolas células inviables). 4×10^4 células fueron sembradas en platos de 24 pozos (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), después de 24 horas fueron tratadas con concentraciones crecientes (1, 2, 5 y 10 μM) de 14-IL, 6-IL, o una combinación de ambas [50%]/[50%] μM , dichos tratamientos se realizaron cada 24 hrs durante 72 hrs. Al final del tratamiento las células fueron desprendidas con tripsina EDTA (300 μL) y diluidas con PBS (700 μL) y llevadas a un volumen final de 1 mL. De esta solución se tomaron 10 μL y se mezclaron con 10 μL de azul de tripano al 0.4% para ser contadas bajo microscopio invertido (Leica modelo DMIL, Alemania) en campo claro con cámara de Neubauer, 4 repeticiones por muestra. La cantidad de células se obtuvo con la siguiente fórmula: promedio de $4n/5$ (número de campos contados en la cámara) \times 10,000 (factor de dilución de la cámara). Los resultados son mostrados como porcentaje de cambio con respecto al control de 72 hrs.

Participación de los PPAR γ en el efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL

Determinación de la proliferación de células MCF-7 tratadas con 6-IL y el antagonista para los PPAR γ GW9662

4×10^4 células fueron sembradas en platos de 24 pozos (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), después de 24 horas fueron tratadas con 6-IL 10 μM , GW9262 0.5 μM o una combinación de ambos (GW9262 0.5 μM durante 2

hrs previo al tratamiento de 6-IL 10 μM), dichos tratamientos se realizaron cada 24 hrs durante 72 hrs. Al final del tratamiento la proliferación celular se evaluó como se describió en el apartado anterior. Debido a que se ha reportado que el antagonista para los PPAR γ GW9662 tiene efectos antiproliferativos *per se* e independientes de los PPAR γ (Seargent et al. 2004), se decidió hacer una curva dosis respuesta para determinar una concentración apropiada para inhibir la formación del complejo PPAR γ /6-IL sin causar efectos antiproliferativos que sesgasen los resultados (Fig. 14A), se decidió emplear una concentración de 0.5 μM para estos experimentos de bloqueo endógeno de los PPAR γ .

Determinación de la inducción de apoptosis por citometría de flujo en células MCF-7 tratadas con 6-IL y GW9262 (antagonista de los PPAR γ)

La determinación de apoptosis se evaluó a través de la identificación del fosfolípido fosfatidilserina presente en el lado externo de la membrana celular como un marcador de apoptosis temprana. Su presencia se puede evidenciar a través de su unión con anexina V, una proteína que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, dicha unión es observable mediante el empleo del fluoróforo Cy5 (que se encuentra biotinilado y se une a anexina V). Se confirma una célula apoptótica al emplear un marcador de células viables como lo es calceína-AM. Este marcador penetra a las células por medio de su grupo acetometil-éster y es atrapado en el interior de las mismas cuando las esterasas endógenas escinden su enlace éster. Ambos marcadores emiten una longitud de onda particular que ubica a la célula en una región específica dentro de una gráfica de puntos, que es interpretada como una población en apoptosis. 2×10^5 células fueron sembradas en platos de 60 mm de diámetro (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), después de 24 horas fueron tratadas con 6-IL 10 μM , GW9262 0.5 μM o una combinación de ambos (GW9262 0.5 μM durante 2 hrs previo al tratamiento de 6-IL 10 μM), dichos tratamientos se realizaron cada 24 hrs durante 48 hrs. Al final del tratamiento las células fueron desprendidas con tripsina EDTA (300 μL) y diluidas con DMEM (700 μL) y llevadas a un volumen final de 1 mL. La apoptosis

fue evaluada por medio de un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, después del tratamiento la densidad celular se ajusta a 1×10^6 por mL en medio basal, se transfieren 200 μ L (200 000 células) a un microtubo de 0.5 mL, se centrifugan a 2500 rpm durante 3 min se desecha el sobrenadante y se resuspenden en *Binding Buffer* 1X (proporcionado por el fabricante), se mezcla gentilmente y se añaden 5 μ L de Anexina V. Incubar 5-10 min en oscuridad a temperatura ambiente, centrifugar a 2500 rpm por e min, eliminar sobrenadante, añadir 200 μ L de *Binding Buffer* y agregar 1 μ L de Calceína AM y 1 μ L de Fluolink Cy5, incubar 5-10 min en oscuridad, centrifugar y desechar el sobrenadante, resuspender en *Cell Buffer* (proporcionado por el fabricante). Colocar las soluciones provistas en el chip del bioanalizador y las muestras en cada pozo. El número de células apoptóticas se reportaron como porcentaje del número de eventos que confluyen en el área estandarizada por el programa Agilent Cell-Chip software.

Sobreexpresión del isotipo gama de PPAR a través de la infección de adenovirus recombinantes

Viabilidad de la infección. Para saber si el empleo de adenovirus como un sistema de sobreexpresión era viable, fue necesario explorar si las células MCF-7 eran capaces de ser infectadas y si sobrevivían a dicha infección. Se obtuvieron adenovirus con una construcción para la expresión de proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) (*AdGFP*), los cuales fueron donados amablemente por el Dr. Salomón Hernández (Universidad Panamericana, México). La identificación de la expresión de GFP se realizó con un microscopio confocal FV 1000 Olympus. Objetivo 20X con el canal rojo a una longitud de onda de 260 nm. Y también se determinó por citometría de flujo a través del protocolo de “Expresión de GFP” en el bioanalizador Agilent 2100, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó que la infección con 80 MOI (*multiplicity of infection*) mostró una infección por arriba del 50% (Fig. 7A). Esto confirma la presencia del receptor CCRX en estas células, el cuál es necesario para su adhesión y posterior

ingreso a la célula, además de confirmar la factibilidad de emplear este tipo de vector como un sistema de sobreexpresión.

Vectores adenovirales. Los adenovirus recombinantes que codifican para el isotipo humano de los PPAR γ (*AdPPAR γ*) fueron donados amablemente por el Dr. B. Staels (Instituto Paster de Lille, Francia). Los adenovirus que codifican para la proteína verde fluorescente (*AdGFP*) fueron tomados como control de infección. Los virus fueron multiplicados en células HEK-293 (donadas por el Dr. Ataúlfo Martínez, Instituto de Neurobiología-UNAM, México). La estimación del título de adenovirus fue realizada por una prueba de multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en inglés) (*AdEasy*TM Vector System, application manual version 1.4).

Efecto citopático en células MCF-7 infectadas. Debido a que la infección por adenovirus secuestra la maquinaria de síntesis de proteínas de las células anfitrionas y por ende es capaz de llevarlas a la lisis celular, se llevó a cabo una evaluación de la cantidad de partículas virales que provocan un efecto citopático sobre células MCF-7, y se determinó la cantidad de MOI que no interfiriera con los experimentos de proliferación. 4×10^4 células fueron sembradas en platos de 24 pozos (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), después de 24 horas fueron infectadas con *AdGFP* en cantidades crecientes de MOI (~20 a ~400) durante 24 hrs, al término de las 24 hrs se reemplazó el medio con vectores por medio completo y se realizó el recambio cada 24 hrs durante 72 hrs. La viabilidad celular se determinó empleando el ensayo de exclusión por azul de tripano descrito previamente. La cantidad de células se reportó como número de células viables. Se determinó que hasta un MOI de 100 era tolerado por las células antes de comenzar a sufrir efecto citopático (Fig. 7B).

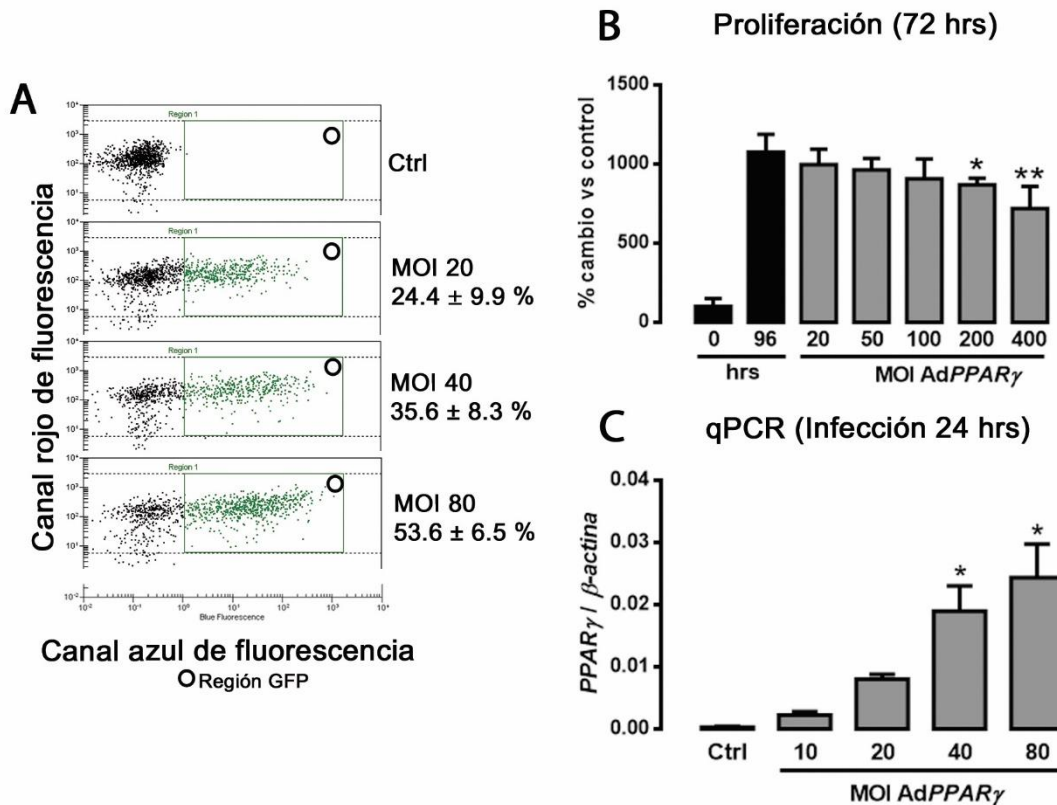


Figura 7. Confirmación del modelo de sobreexpresión de los PPAR γ . **A.** Paneles representativos del ensayo de eficiencia de infección por GFP. 2×10^5 células MCF-7 fueron infectadas con AdGFP en multiplicidad de infección (MOI) creciente (~20 a ~80) durante 24 hrs. La expresión de GFP es reportada como porcentaje positivo con respecto al número total de eventos. **B.** Se evaluó el efecto citopático de la infección por AdPPAR γ en MOI creciente (~20 a ~400) a través del ensayo de exclusión por azul de tripano. Se puede notar que hay diferencia significativa a partir de MOI 200. Un asterisco representa diferencias estadísticamente significativa de $P = <0.05$ y dos asteriscos de $P = <0.01$ con respecto al control de 96 hrs. **C.** Se evaluó la expresión de los PPAR γ mediante qPCR en células infectadas con AdPPAR γ en MOI creciente (~10 a ~80), la expresión se normalizó mediante el gen constitutivo β -actina. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativa de $P = <0.05$ con respecto al

Extracción de RNA para la evaluación de la sobreexpresión de los PPAR γ mediante retrotranscripción y PCR cuantitativo. La extracción de RNA total se hizo con TRIzol® Reagent (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), siguiendo el protocolo que a continuación se detalla. 5×10^5 células MCF-7 fueron sembradas en cajas de 60 mm de diámetro (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) después de 24 hrs fueron infectadas con AdPPAR γ a concentraciones crecientes de MOI (~10 a ~80), 24 hrs después se retiró el medio y se añadieron

600 μL de TRIzol, cubriendo de manera homogénea la superficie del plato, el cual se colocó inmediatamente en hielo seco, después de 5 minutos, se descongeló y se desprendieron las células de forma mecánica mediante una espátula de plástico, las células se colectaron en un microtubo de 1.5 mL, se añadió 0.12 mL de cloroformo mezclándolo por inversión y se incubaron durante 2-3 min T.A. para posteriormente centrifugarse a 12.000 g, durante 15 min a 4°C. Después de la centrifugación se separó la fase acuosa (superior) y el RNA se precipitó con 0.25 ml de isopropanol, mezclándolo por inversión, después de 3 minutos de incubación a T.A. se centrifugaron a 12.000 g, durante 10 min a 4°C. El botón se lavó con 1 ml de etanol al 70% frío y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4°C. Después de evaporar el etanol el botón de RNA se resuspendió en 50 μL agua estéril. Su cuantificación y determinación de pureza se realizó mediante un espectrofotómetro a través de un cociente de absorbancia 260/280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Fischer Scientific, MA, EUA) empleando 2 μL de muestra y la lectura obtenida se reportó en ng/ μL .

Retrotranscripción y PCR cuantitativo (qPCR). Dos microgramos de RNA fueron sometidos a retrotranscripción utilizando el sistema Superscript II (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA) (1 μL), en una mezcla de Oligo DT (0.25 μL), cofactor DTT (3 μL), DNTP's (nucleótidos, 3 μL), RNAase Out (2.5 μL) y el volumen restante ocupado por agua estéril para un volumen final de 20 μL . La mezcla fue incubada en un termociclador (marca) a los siguientes tiempos, 55°C durante 20 min., 94°C durante 40 min y 4°C como temperatura final. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) fue realizada en un sistema de detección Roto-Gene 3000 (Corbett Research, Mortleake, Reino Unido) empleando el sistema SYBR Green como un marcador para la amplificación de DNA. La reacción fue realizada con 1 μL de cDNA como templado y el kit qPCR supermix-UDG (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA). Se realizaron 39 ciclos con 3 pasos dentro de la amplificación (94°C por 30 seg, 62°C por 30 seg, 72°C 30 seg) con oligonucleótidos/primers específicos para cada gen (Tabla 1)

(Nuñez-Anita et al. 2009). La confirmación del gen producido por la PCR se demostró a través de electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio en buffer TAE 1X y se visualizó mediante un transiluminador convencional de luz UV. No se observó el producto de la PCR en ausencia de templado. La expresión del gen se calculó utilizando el método “Dcycle threshold” (Dct) y normalizado para actina, como un gen constitutivo o no regulado (*housekeeping*). Se pudo observar que a partir de un MOI 40 de AdPPAR γ había una sobreexpresión significativa de PPAR γ comparado con las células no infectadas (Fig. 7C).

Inducción de la expresión de FASN para confirmar la sobreexpresión funcional de PPAR γ

Para determinar si la sobreexpresión del isotipo PPAR γ era funcional, se evaluó la expresión de *FASN*, un gen que responde a dicho receptor (Bogacka et al. 2004; Kadegowda et al. 2009) y se evaluó su activación a través de PCR cuantitativo (qPCR, por sus siglas en inglés). 5×10^5 células fueron sembradas en platos de plástico de 6 cm de \varnothing , 24 hrs después fueron tratadas, formando los siguientes grupos: 1) Control (Ctrl) 2) Control de infección sin tratamiento (Ctrl AdPPAR γ) 3) Células infectadas tratadas con 6-IL 10 μ M (AdPPAR γ +6IL), los grupos con infección fueron expuestos durante 24 hrs a AdPPAR γ , al término de este tiempo fueron tratados como se mencionó, durante 24 hrs y al final de este tiempo fueron colectadas para extracción de RNA. El cDNA para la qPCR se obtuvo por medio del método de retrotranscripción anteriormente descrito. Las temperaturas de alineación, secuencia sentido/antisentido y referencia de *FASN*, se mencionan en la Tabla 1.

Determinación de la proliferación celular y apoptosis en células MCF-7 infectadas por AdPPAR γ y tratadas con 6-IL y GW9262

Proliferación. Células MCF-7 fueron sembradas en platos de 24 pozos a una densidad de 4×10^4 en medio basal (descrito previamente en la sección de

“Cultivos celulares”), 24 hrs después fueron infectadas con MOI ~50 de AdPPAR γ y AdGFP como control de infección durante otras 24 hrs. Al término de este tiempo fueron tratadas con 10 μ M de 6-IL y GW9262 0.5 μ M, o GW9262 0.5 μ M durante 2 hrs previas al tratamiento de 10 μ M de 6-IL cada 24 hrs durante 72 hrs. Al final del tratamiento la viabilidad celular se determinó por el método de exclusión con azul de tripano, como previamente ha sido descrito.

Gen	Secuencia (5' – 3')		Temperatura de alineación (°C)	Referencia
<i>FASN</i>	Sentido	GGAATGGGAAGACACCTATGGA	62	GenBank NM_004104.4
	Antisentido	AGAGAGAGCTCAGATACGTTGAC		
<i>PPARγ</i>	Sentido	TCTCTCCGTAATGGAAGACC	62	GenBank L40904.2
	Antisentido	GCATTATGAGACATCCCCAC		
<i>β-actina</i>	Sentido	CCATCATGAAGTGTGACGTTG	62	GenBank NM_001101.3
	Antisentido	ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA		
<i>PPARγ</i> Sondas de Hidrólisis	Sentido	GATGTCTCATAATGCCATCAGGTT	60	RTPrimerDB ID: 5471
	Antisentido	GGATTCAGCTGGTTCGATATCACT		
	Sonda	CCAACAGCTTCTCCTTCTCGGCCTG		
<i>β-actina</i> Sondas de Hidrólisis	Sentido	TCCTTCCTGGGCATGGAG	60	RTPrimerDB ID: 2418
	Antisentido	AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT		
	Sonda	CCTGTGGCATCCACGAAACTACCTTC		

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos sentido/antisentido y en su caso sondas, de los genes utilizados para evaluar la expresión de los PPAR γ , así como su sobreexpresión funcional. Se refieren también la temperatura de alineación y el número de acceso a GenBank.

Apoptosis. La determinación de apoptosis se evaluó a través de la identificación de la fosfatidilserina por citometría de flujo como previamente se describió. Siete grupos de células MCF-7 fueron sembradas en platos de 60 mm de diámetro a una densidad de 2×10^5 en medio basal, 24 hrs después 4 grupos fueron infectadas con MOI ~50 de AdPPAR γ (3 grupos) y AdGFP (1 grupo) como control de infección durante otras 24 hrs. Al término de este tiempo fueron tratadas con 10 μ M de 6-IL o con GW9262 0.5 μ M, o GW9262 0.5 μ M durante 2 hrs previas al tratamiento de 10 μ M de 6-IL cada 24 hrs durante 48 hrs, un grupo no fue tratado y fue utilizado como control.

Generación de línea celular estable con silenciamiento de los PPAR γ

Características del vector HuSH™ pGFP-V-RS con el RNA de interferencia para PPAR γ . Para confirmar que la vía antiproliferativa y apoptótica es mediada por PPAR γ y está activada por la 6-IL, se decidió silenciar al RNA mensajero de éste isotipo del receptor. Para ello se generó una línea celular estable mediante el vector pGFP-V-RS de la serie HuSH™ (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) el cual se basa en un casete de expresión que contiene la secuencia de un RNA de horquilla corta (*small hairpin* “shRNA” por sus siglas en inglés), con un promotor de tipo U6. Esta región así como el gen de selección para eucariontes que confiere resistencia a puromicina, se encuentran flanqueados a ambos lados por las repeticiones terminales largas (*LTR's* por sus siglas en inglés) 5' y 3' del Virus de Leucemia Murina de Moloney (MMLV) lo que provoca que se lleve a cabo una replicación viral deficiente, que asegura una expresión estable. El gen de selección para eucariontes (puromicina) presenta un promotor de tipo SV40. El kit constaba de 4 shRNA con una secuencia específica diferente por cada uno de ellos, de 29 nucleótidos para el gen diana, en este caso PPAR γ y también se contó con un vector con una secuencia aleatoria (Scramble) como control de transfección. Inmediatamente después se encuentra un *loop* u horquilla de 7 nucleótidos y una secuencia reversa complementaria de otros 29 nucleótidos. Finalmente una secuencia de terminación (TTTTTT) es colocada al final de los

nucleótidos complementarios (de reversa) para que se complete la transcripción mediante la Polimerasa de RNA tipo III. Es importante mencionar que el vector también cuenta con el gen reportero *tGFP*, lo que ayuda a reconocer la eficiencia de transfección e identificar las poblaciones que han incorporado de manera estable al vector (Fig. 8A). Estos vectores se amplificaron en bacterias competentes *Escherichia coli* XLBlue con 10 µg de kanamicina como antibiótico de selección (también incorporado en el constructo del plásmido) por cada mL de medio de Luria y se purificaron mediante kit comercial *High pure, Plasmid Isolation Kit* (Roche applied science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany), obteniéndose alrededor de 100 ng de DNA/µL. Los detalles del mapa del vector se encuentran en la figura 8.

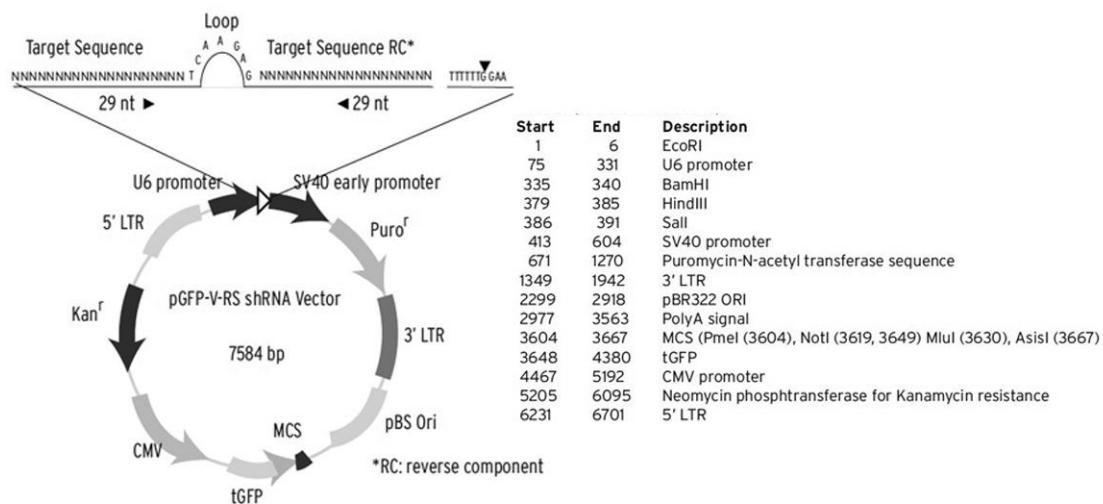


Figura 8. Características del vector pGFP-V-RS, OriGene. La secuencia del shRNA que contiene la secuencia del RNA de interferencia para los PPAR γ no se plasma debido a que pertenece a una patente comercial, sin embargo, se puede observar la localización de su promotor U6 y la presencia de los “cassettes” de expresión para Kanamicina, Puomicina y GFP.

Transfección. 1×10^6 células MCF-7 fueron transfectadas con 5 µg de plásmido, tanto los dirigidos contra los PPAR γ , como la secuencia aleatoria, desde ahora denominada: “Scramble”. Para la transfección se empleó el reactivo XfectTM (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, EUA) y se siguieron las instrucciones

del fabricante. Las células fueron mantenidas en estas condiciones durante 48 hrs y al término de este tiempo se inició su selección con 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puomicina durante 2 semanas y se permitió su expansión. Para confirmar la transfección se evaluó la expresión de GFP usando un microscopio Olympus IX50 de luz invertida con sistema de fluorescencia (Olympus Inc., NY, EUA) y también a través de citometría de flujo en el equipo *Agilent 2100 bioanalyzer* empleando un chip para ensayo celular (Agilent, Technologies, EUA) (Fig. 9A). Después de obtener 5 platos con aproximadamente 5×10^6 células con expresión positiva para GFP, se continuaron con los ensayos de qPCR con sondas de hidrólisis y Western blot, para la confirmación de silenciamiento de los PPAR γ .

PCR cuantitativo con sondas de hidrólisis. Se extrajo RNA total de las células transfectadas en las mismas condiciones descritas anteriormente (Págs. 32-34). Y se llevó a cabo una PCR cuantitativa (Pág. 34), sin embargo, se emplearon sondas de hidrólisis tanto para los RNA mensajeros de PPAR γ como para los de β -actina. La particularidad de este método es que la cuantificación del número de copias está directamente relacionado con la señal emitida por el consumo de sondas durante la amplificación. La normalización se realizó con el gen de referencia β -actina. La secuencia sentido, antisentido y de la sonda se especifican en la Tabla 1 y los resultados en la figura 9B.

Western blot. 3×10^6 células MCF-7 transfectadas de cada plato (4 para PPAR γ y 1 para Scramble) y células no transfectadas fueron lisadas con solución amortiguadora RIPA (50 mM Tris pH 7.4, 0.5% NP-40, 100 mM NaCl) y con una tableta de inhibidores de proteasas libre de EDTA, *complete Mini* (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), seguido de centrifugación a 12,000 rpm por 2 min. a 4°C. Las proteínas extraídas fueron cuantificadas por el método de Bradford (ensayo de proteínas de Bio-Rad, Hercules, CA. EUA). Se prepararon geles de poliacrilamida al 15% (gel separador) y se cargaron 50 μg de proteína por cada pozo/carril. Después de la electroforesis las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Alemania), la cual fue bloqueada toda la

noche con TTBS (100 mM Tris, 2.5 M NaCl pH 7.5, EDTA y 0.05% Tween 20) y leche descremada al 5%. Después de este tiempo las membranas fueron lavadas 3 veces/10 min. con TTBS y posteriormente incubadas con el anticuerpo policlonal anti-PPAR γ (sc-7196, 57 kDa, 1:1000 en TBS 5% de leche descremada, Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA) o anti- β -actina (sc-1616, 43 kDa, 1:10,000 en TBS 5% de leche descremada, Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA). Seguido de 3 lavados de 10 min. cada uno con TTBS, para posteriormente incubarse con anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (Diluciones de 1:3,000). La señal de la presencia de las proteínas se detectó mediante el sistema quimioluminiscente ECL (Amersham Biosciences, UK). Los valores de la actina fueron utilizados para normalizar los resultados de los PPAR γ . El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el software Image LabTM (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) (Fig. 9C). Se escogieron las células con un silenciamiento mayor a 70% demostrado por qPCR y Western blot. A las células resultantes se les denominó de la siguiente manera: células MCF-7 RNAi-PPAR γ , aquellas con la expresión estable del RNA de interferencia para PPAR γ ; células MCF-7 Scramble-PPAR γ , aquellas con expresión estable del RNA de interferencia aleatorio, el cual no provoca silenciamiento y células MCF-7 WT (“wild type”), a aquellas que son de tipo parental y que no fueron sometidas a transfección.

Determinación de la proliferación celular y apoptosis en células MCF-7 RNAi-PPAR γ , Scramble-PPAR γ y WT tratadas con 6-IL

Proliferación. Células MCF-7 RNAi-PPAR γ , Scramble-PPAR γ y WT fueron sembradas en platos de 24 pozos a una densidad de 4×10^4 en medio basal, 24 hrs después fueron tratadas con 10 μ M de 6-IL cada 24 hrs durante 96 hrs, también se sembraron sus respectivos controles. La proliferación celular se determinó de igual manera cada 24 hrs hasta concluir el experimento por el método de exclusión con azul de tripano, como previamente se describió (Pág. 30). Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado por cada tiempo y por cada grupo. Los resultados se expresan como porcentaje de cambio con

respecto a la hora cero de cada uno de los grupos y también se analizaron diferencias entre tiempos y grupos. El análisis estadístico para este experimento empleó una prueba de ANOVA de dos vías.

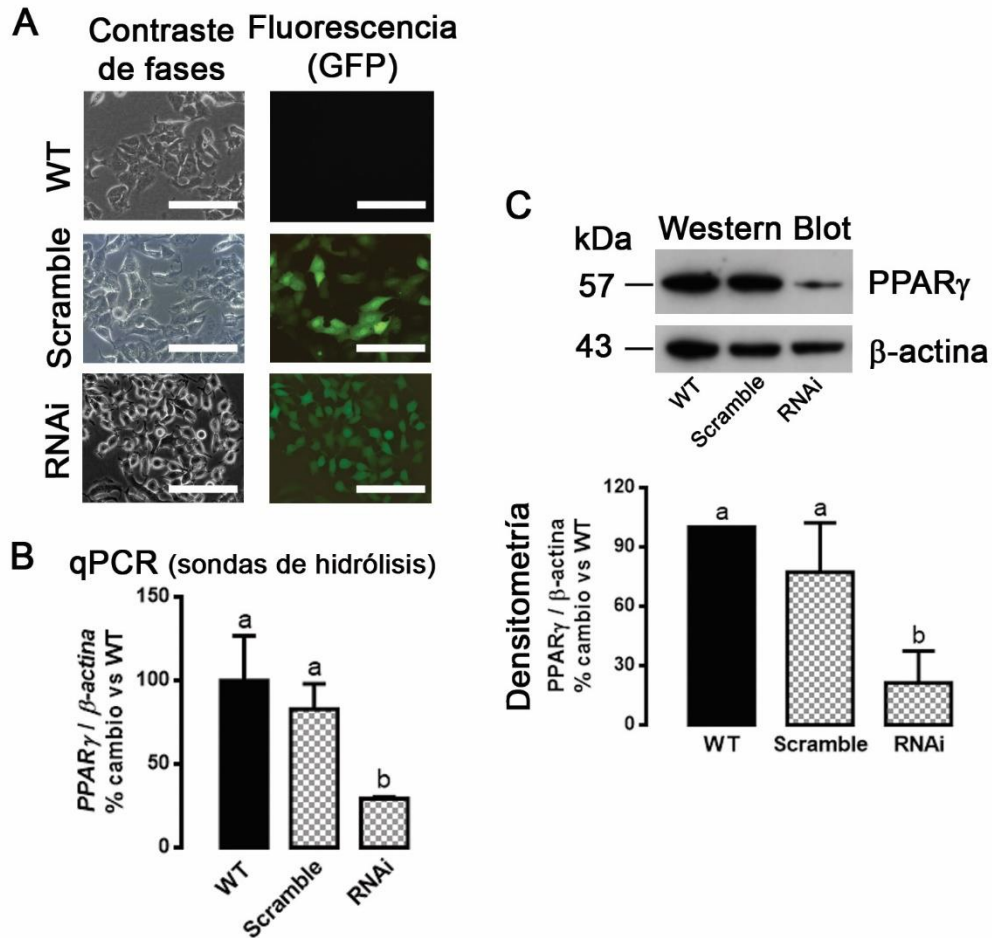


Figura 9. Confirmación del modelo de silenciamiento de los PPAR γ . **A.** Fotomicrografías representativas de la expresión de GFP (paneles derechos) en las células seleccionadas que presentaron una transfección estable del RNAi de interferencia contra PPAR γ (RNAi) y con la secuencia aleatoria (Scramble), las células no transfectadas (WT) no presentan expresión, se muestran las imágenes por contraste de fase para orientación (objetivo 20X, barra de escala de 50 μ m). **B.** La expresión de PPAR γ en las células establemente transfectadas se evaluó a través de PCR en tiempo real (qPCR) con el sistema de sondas de hidrólisis, los resultados de la expresión de PPAR γ se normalizaron con la expresión de β -actina. **C.** La proporción de proteína PPAR γ presente en las células transfectadas de manera estable, se evaluó mediante Western blot y la densitometría de las bandas obtenidas se realizó con el programa de computadora Image Lab™. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos diferentes, las letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas de $P = <0.05$ entre los grupos.

Apoptosis. La determinación de apoptosis se evaluó a través de la identificación de fosfatidilserina por citometría de flujo como previamente se describió (Págs. 31-32). Dos grupos de células MCF-7 RNAi-PPAR γ , Scramble-PPAR γ y WT fueron sembradas en platos de 60 mm de diámetro a una densidad de 2×10^5 en medio basal, 24 hrs después fueron tratadas con 10 μ M de 6-IL cada 24 hrs durante 48 hrs, uno de los grupos no fue tratado y se empleó como control. Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado. Los resultados se expresan como porcentaje de cambio con respecto a su control y también se analizaron diferencias entre grupos. El análisis estadístico para este experimento empleó una prueba de ANOVA de una vía.

Efecto de la 6-IL sobre la migración celular

Ensayos de cicatrización de herida. Células MCF-7 RNAi-PPAR γ , Scramble-PPAR y WT fueron sembradas con medio basal en platos de 60 mm de diámetro (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), 8×10^5 células en cada caso. Después de 24 hrs se realizaron 3 heridas paralelas en el fondo del plato con la punta de una pipeta de 1000 μ L (~337 μ m) y las células fueron tratadas con 6-IL 10 μ M o vehículo (etanol) por 24 hrs. Al término de este tiempo se realizaron 3 nuevas heridas como control de anchura de herida con el mismo tipo de punta de pipeta, el número de células migrantes se obtuvo contando el número de células dentro de las heridas experimentales guiados por dos líneas trazadas en los bordes de las heridas paralelas entre ellas y con el ancho promedio obtenido en cada experimento. El conteo se realizó con el programa para computadora *Leica Application Suite Version 2.8.1* y las imágenes se capturaron con un objetivo de 10X empleando un microscopio Leica DM 2500 y una cámara digital DFC 420 (Leica Microsystems, CMS GmbH, Alemania). Al menos 3 campos por plato fueron analizados y cada grupo fue analizado en 3 experimentos independientes. Los resultados se presentan como número de células migrantes.

Evaluación de la participación de la vía extrínseca de la apoptosis en el efecto apoptótico del I₂ y la 6-IL

Evaluación de la actividad de caspasa 8/FLICE. 5X10⁶ células MCF-7 fueron colectadas después de 48 hrs de incubación con I₂ o 6-IL y también células no tratadas como control. El botón de células fue lisado con solución amortiguadora RIPA (50 mM Tris pH 7.4, 0.5% NP-40, 100 mM NaCl) y con una tableta de inhibidores de proteasas libre de EDTA, *complete Mini* (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), seguido de centrifugación a 12,000 rpm por 2 min. a 4°C. Las proteínas extraídas fueron cuantificadas por el método de Bradford (ensayo de proteínas de Bio-Rad, Hercules, CA. EUA). Para medir la actividad de caspasa se empleó el kit comercial *ApoTarget* (Invitrogen Co., CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron alícuotas procedentes de cada grupo, de 200 µg de proteínas con DTT (10 mM) y el substrato colorimétrico IETD-*p*-nitroanilina (*p*NA, concentración final de 200 µM) a 37°C por 120 min. en oscuridad. Al final de este tiempo, las muestras fueron leídas a través de un lector de ELISA Bio-Rad 680 (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) a 450 nm. La absorbancia del *p*NA de los grupos tratados fue comparada con el grupo control para determinar las veces de cambio.

Análisis estadístico

Se realizaron prueba estadísticas ANOVA de una y dos vías para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y en experimentos determinados, seguidas de una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre grupos experimentales múltiples. Valores de *P* <0.05 o por debajo de este valor fueron considerados estadísticamente significativos. En las figuras, un asterisco indica diferencias significativas con respecto al control y letras distintas indican diferencias significativas entre grupos (*P* <0.05).

RESULTADOS

Las células neoplásicas MCF-7 contienen mayor cantidad de AA que las células de fenotipo normal MCF-12F

Previamente se había reportado la existencia de una concentración 4 veces mayor de AA en tumores mamarios generados por MNU, en comparación con glándulas mamarias normales de rata (Aceves et al. 2009). Para saber si las células epiteliales neoplásicas de origen humano MCF-7 también contenían una mayor concentración de AA (el cual sirve de sustrato para la generación de 6-IL), que células epiteliales humanas normales (MCF-12F) se realizó la extracción de lípidos por medio del método de Bligh-Dyer. El extracto obtenido se sometió a un proceso de metanólisis alcalina para hidrolizar los enlaces éster y obtener el AA presente en los fosfolípidos de membrana y así cuantificar a través de HPLC el AA total. El tiempo de retención del AA fue de 33.08 minutos. El área de pico fue calculada y se realizó una curva estándar de AA de 2-50 μM . El área del pico correspondiente al AA de tres muestras independientes de ambos tipos celulares fueron interpolados a partir de la curva estándar obteniendo una concentración 1.5 veces mayor de AA en células MCF-7 en comparación a la cantidad presente en células MCF-12F (fig. 10).

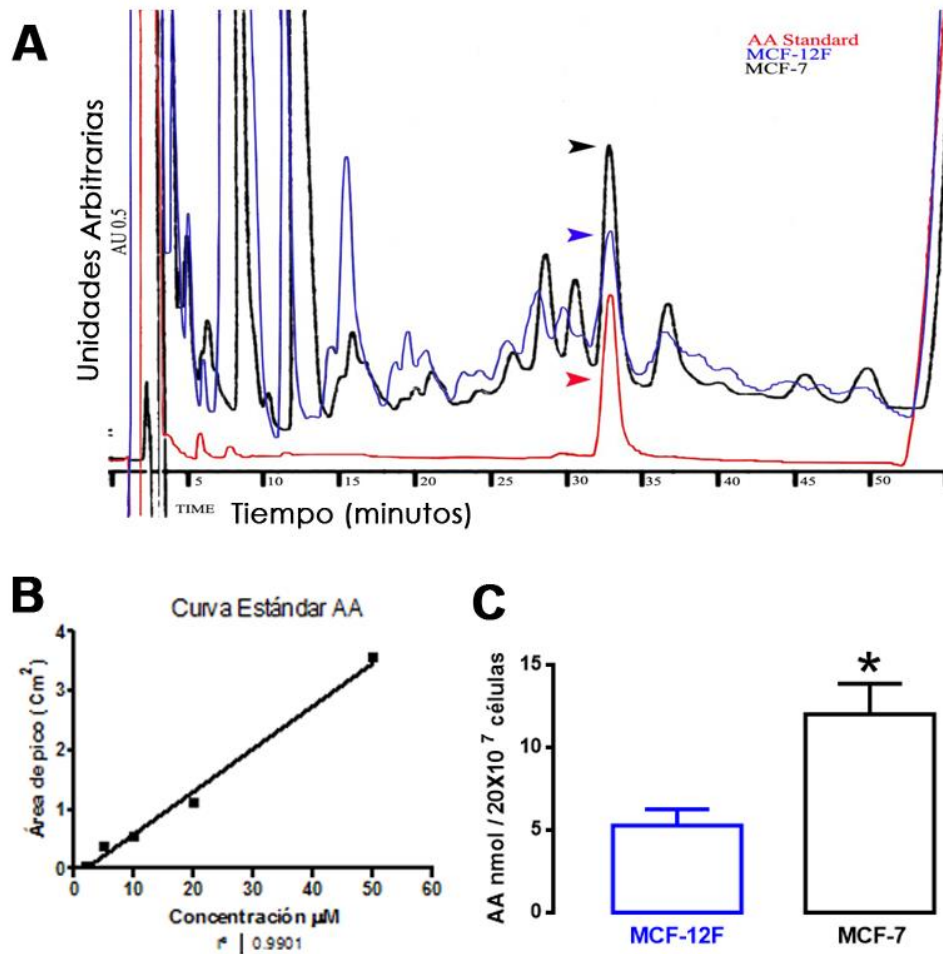


Figura 10. Cuantificación de AA entre células normales y tumorales. **A.** Cromatograma representativo de los extractos lipídicos de células MCF-7 (negro) y MCF-12F (azul), traslapados con el estándar de ácido araquidónico (rojo) (20 μM, tiempo de retención 33.08 min). **B.** Curva estándar de ácido araquidónico ($r^2 = 0.9901$), con la cual se realizó la interpolación de los resultados. **C.** Concentración total de AA en células MCF-7 y MCF-12. Los datos son expresados como media \pm DS (n=3). La diferencia entre los grupos fue analizada usando una prueba de *T* de Student. El asterisco indica diferencias significativas entre ambos grupos ($P < 0.05$).

Síntesis y purificación de yodolactonas

El producto crudo obtenido del trabajo de extracción tradicional del AA yodado, es una mezcla de 6-IL, 14-IL y AA (Fig. 6). Con las modificaciones al método descritas en “Materiales y Métodos” fue posible separar ambas yodolactonas sin remanentes de AA contaminante. La inversión en el método es menor (7 hrs) en comparación al método tradicional (48 hrs). El análisis por cromatografía de gases del producto obtenido de la yodación del AA generó dos picos mayoritarios, el primero (A) en 24.37 min, el segundo (B) en 26.59 min (Fig. 11). El espectro de masas de cada pico reveló un ion en m/z 303, sin embargo en el pico B la abundancia de este ion fue mayor que en el pico A. El pico B corresponde a la 6-IL debido a la alta abundancia del ion m/z 303 (Fig. 11C), además del patrón espectrométrico anteriormente reportado por Boeynaems (Boeynaems & Hubbard 1980). La lactona macrocíclica presente en la estructura molecular, probablemente corresponda a la 14-IL (pico A). Este compuesto parece ser muy inestable y susceptible a hidrólisis, debido a ello la presencia del ion m/z 303 en la cámara de ionización es baja (Fig. 11B). La modificación metodológica empleada en este estudio, permitió separar y purificar nuestro compuesto de interés (6-IL) para ser usado como estándar para su identificación en extractos lipídicos de los cultivos celulares MCF-7 y MCF-12F.

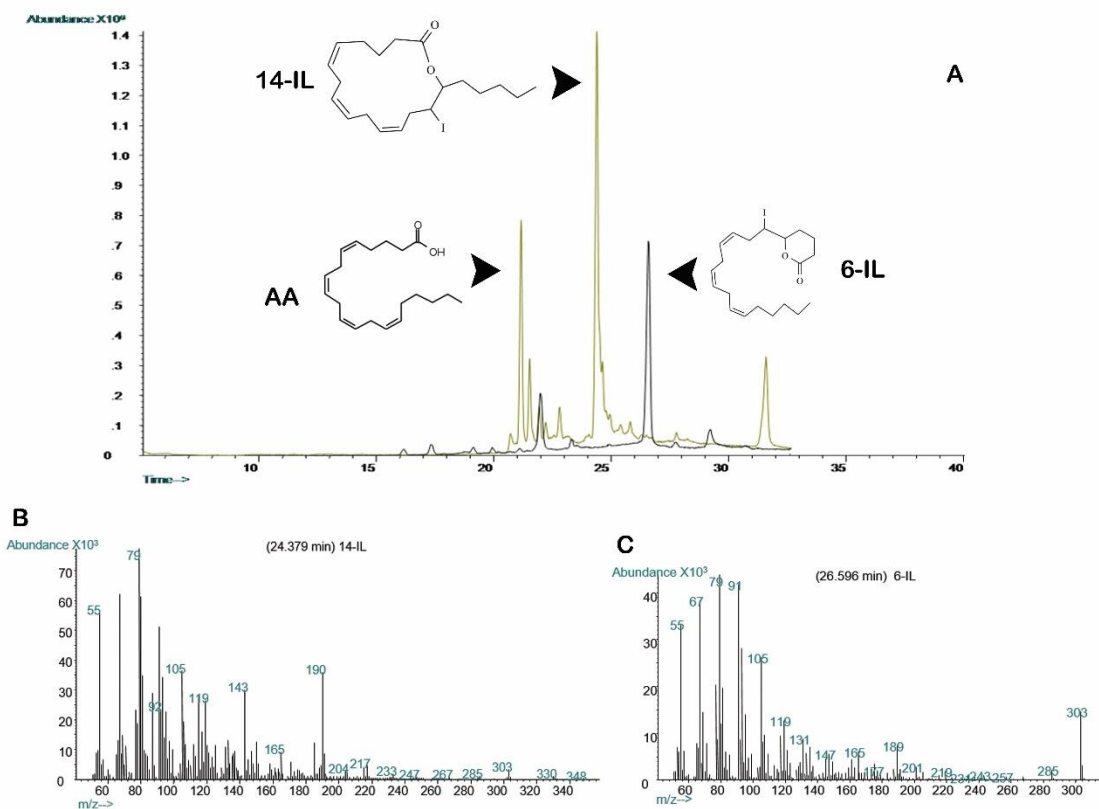


Figura 11. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de productos obtenidos de la yodación del AA. A. La reacción entre AA y I₂ en acetonitrilo bajo atmosfera de nitrógeno generó dos productos mayoritarios: 14-IL (24.37) y 6-IL (26.59), la estructura molecular se representa respectivamente. B y C, los espectros de masa de cada compuesto muestran una diferencia en la abundancia del ion m/z 303. La estructura molecular y el patrón de fragmentación de los picos correlacionan con la 14-IL y la 6-IL respectivamente.

La 6-IL y la 14-IL inhiben la proliferación de células MCF-7

El efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular tiroideo de la 14-IL se ha explorado en modelos *in vivo* (Chazenbalk et al. 1988; Pisarev et al. 1992a; Pisarev et al. 1994); sin embargo, su acción sobre células de estirpe mamario no se conoce (a diferencia de la 6-IL, el cual ya se ha descrito), por lo que se decidió explorar el impacto que la 14-IL tiene sobre la proliferación y la apoptosis en células MCF-7. Además, dado que teóricamente la 14-IL es un ácido graso yodado que también se puede generar en sistemas *in vivo* y que se obtiene a la par de la 6-IL en el sistema *in vitro* que se emplea en el laboratorio, surgió la necesidad de evaluar su papel sobre el modelo de cultivo celular de cáncer mamario. La figura 12 muestra el efecto antiproliferativo de ambas yodolactonas, el cual es dependiente de la concentración. En el caso de la 6-IL su efecto es significativo desde 5 μM (Fig. 12A), mientras que para la 14-IL la concentración parece ser menor (2 μM) (Fig. 12B). De manera interesante, la combinación equimolar de ambas yodolactonas (Fig. 12C) pareciera tener un efecto sinérgico sobre la inhibición de la proliferación en concentraciones de 1 y 2 μM , lo que haría sospechar que activan vías moleculares distintas; sin embargo, en concentraciones mayores (5 y 10 μM) el resultado parece ser simplemente sumativo, orientándonos hacia la posibilidad de que ambos compuestos trabajen sobre la misma ruta, esta opción se refuerza más adelante con los resultados de la figura 15, en el contexto de inducción y bloqueo de apoptosis. En la figura 12D se puede observar que el empleo de 10 μM en el caso de ambos compuestos mantiene un efecto antiproliferativo a lo largo de 96 hrs. Por otro lado, la 14-IL también es capaz de inducir apoptosis de manera muy semejante a la 6-IL, a las mismas concentraciones (Fig. 13). De hecho la imagen muestra que la inducción de apoptosis también es dependiente de la concentración de 14-IL.

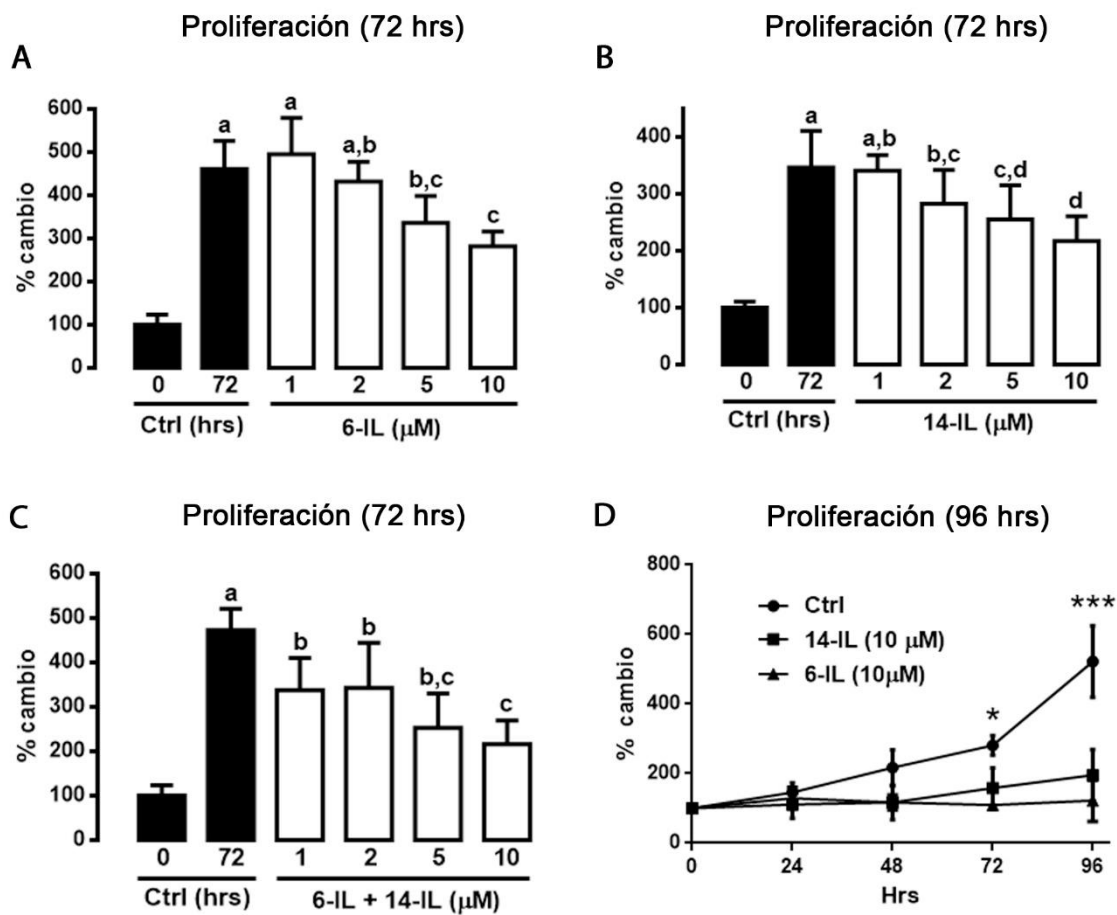


Figura 12. Efecto de la 6-IL y la 14-IL sobre la viabilidad celular. A-C. 4×10^4 células MCF-7 fueron tratadas con 6-IL (A) o 14-IL (B) o una combinación de ambas (C) a distintas concentraciones durante 72 hrs, posteriormente fueron desprendidas y contadas utilizando el ensayo de exclusión por azul de tripano. D. Curva tiempo-respuesta con la adición de ambas yodolactonas (10 μ M). Los datos son expresados como media \pm DE ($n=3$) del porcentaje de cambio con respecto al control. Las letras distintas indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$). Un asterisco indica diferencia estadística de $P < 0.05$ y tres asteriscos diferencia

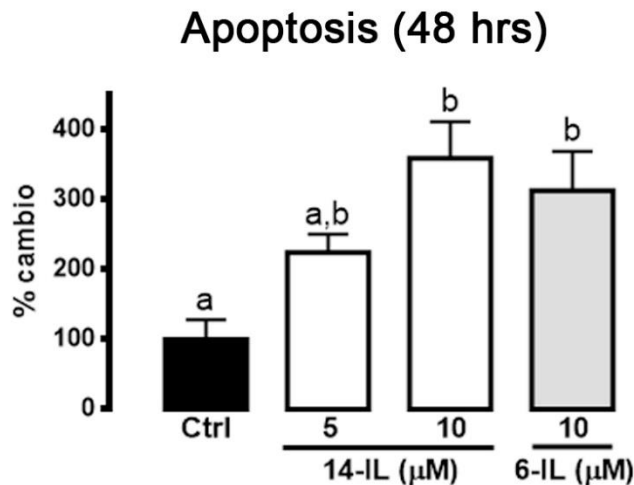


Figura 13. Efecto de la 14-IL y de la 6-IL sobre la inducción de apoptosis. 2×10^5 células MCF-7 fueron tratadas con 14-IL (5 o 10 μM) o 6-IL (10 μM) durante 48 hrs, posteriormente fueron cosechadas y la presencia de fosfatidilserina extracelular fue evaluada mediante citometría de flujo. Los datos son expresados como media \pm DE ($n=3$) del porcentaje de cambio con respecto al control. Las letras distintas indican diferencias significativas entre grupos (P

El bloqueo de la activación de los PPAR γ endógenos por el antagonista GW9662 inhibe los efectos de la 6-IL

Proliferación. Para demostrar que el efecto antiproliferativo de la 6-IL es mediado por la activación de los PPAR γ , se empleó un antagonista altamente selectivo GW9662, el cual modifica el residuo cisteína²⁸⁵ localizado en el dominio de unión a ligando, inhibiendo la actividad transcripcional de los PPAR γ (Leesnitzer et al. 2002). Se puede observar en la figura 14, que el tratamiento con 6-IL ejerce un significativo efecto antiproliferativo. El antagonista GW9662 no tiene efectos sobre la viabilidad celular a 0.5 μM , pero es capaz de bloquear el efecto de la 6-IL cuando se administra previamente (Fig. 14B).

Apoptosis. Las mismas condiciones experimentales empleadas arriba, salvo el tiempo (48 hrs), se utilizaron para evaluar el bloqueo del efecto apoptótico de la 6-IL. Dicho efecto se determinó mediante la identificación de fosfatidilserina a través de citometría de flujo, como previamente se describió en la sección de

“Materiales y Métodos”. Los resultados indican que la 6-IL induce un proceso apoptótico en aproximadamente 2 veces más, comparado con la apoptosis basal de la población control. Sin embargo, el empleo del antagonista GW9662 bloquea el efecto de la 6-IL manteniendo un porcentaje de apoptosis a niveles semejantes al control no tratado (Fig. 14C-D).

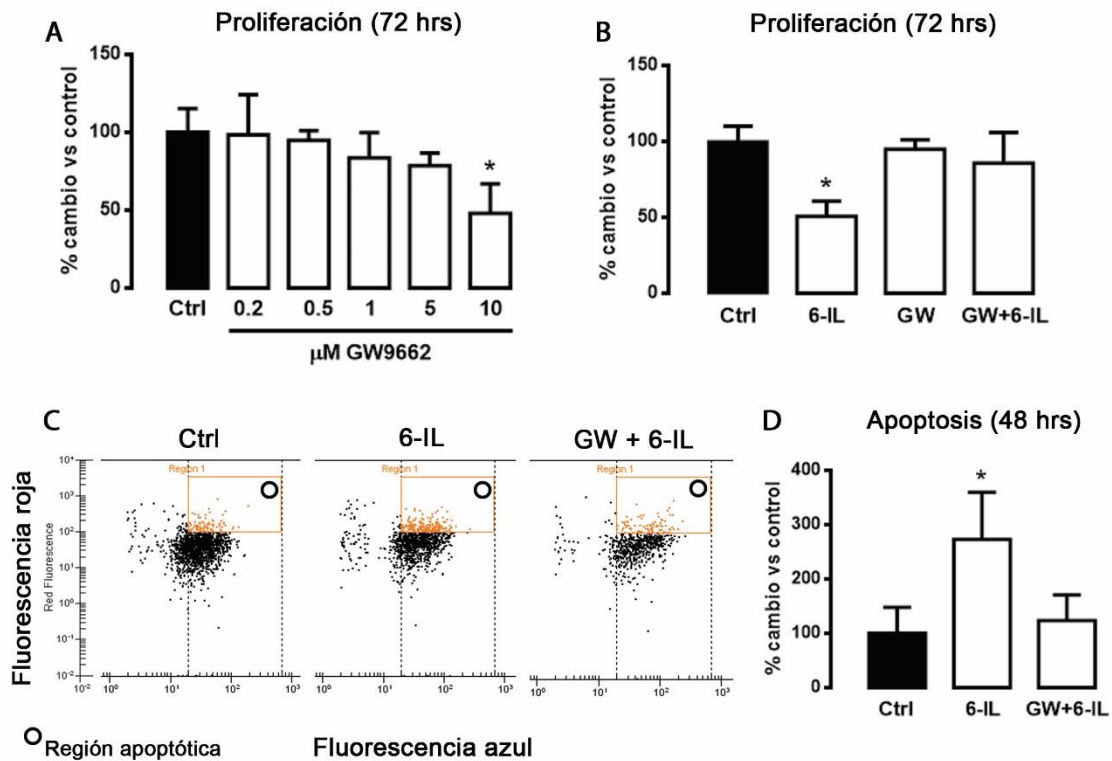


Figura 14. Bloqueo del efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL mediado por los PPAR γ . **A.** Curva dosis respuesta de células MCF-7 tratadas con GW9662 a concentraciones crecientes (0.2 – 10 μ M). Se determinó emplear una concentración 0.5 μ M (dado que no genera efectos antiproliferativos) para los ensayos posteriores. **B.** Proliferación de células MCF-7 control y tratadas con 6-IL (10 μ M), GW9662 (0.5 μ M) y el tratamiento previo de GW9662 (0.5 μ M, 2 hrs antes) a la administración de 6-IL. El ensayo fue realizado mediante exclusión por azul de tripano. **C.** Paneles representativos del ensayo de apoptosis por citometría de flujo en el cual se resalta (recuadro rojo) los eventos apoptóticos en el grupo control, grupo tratado con 6-IL y grupo tratado con GW9662 (0.5 μ M) 2 hrs previo a la administración de 6-IL, respectivamente. **D.** Resultados completos del ensayo de apoptosis. Los resultados son expresados como porcentaje de cambio con respecto al control y se presenta la media \pm DS ($n=4$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($P < 0.05$).

De manera interesante la 14-IL tiene un comportamiento semejante, pues induce apoptosis en el grupo tratado alrededor de 3 veces más y este efecto también se inhibe con GW9662 (Fig. 15).

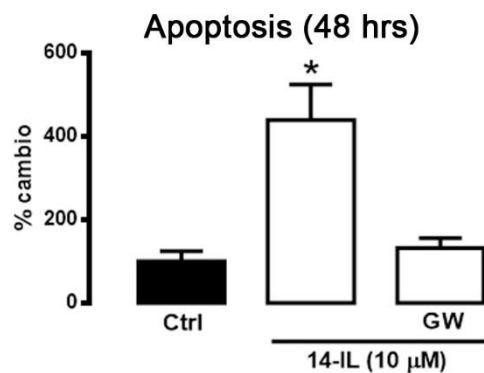


Figura 15. Bloqueo del efecto apoptótico de la 14-IL. Ensayo de apoptosis por citometría de flujo (48 hrs) en el cuál células MCF-7 fueron tratadas con 14-IL (10 μM) y otro grupo fue tratado previamente (2 hrs) con GW9662 (0.5 μM) y posteriormente se administró 14-IL (10 μM). Los resultados son expresados como porcentaje de cambio con respecto al control y se presenta la media ± DS ($n=4$). El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control ($P < 0.05$).

La sobreexpresión de los PPAR γ exagera el efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL; sin embargo, estos son bloqueados por el GW9662

Sobreexpresión funcional. Para saber si la sobreexpresión de PPAR γ por el vector viral era funcional, se evaluó la expresión del RNA mensajero del gen Sintasa de Ácidos Grasos (*FASN*), el cual es un gen que responde a los PPAR γ (Bogacka et al. 2004; Kadegowda et al. 2009). Se puede observar que la sobreexpresión de PPAR γ induce por sí misma una tendencia a aumentar la expresión relativa del RNAm de *FASN* respecto al control, esta expresión se eleva al doble cuando las células son tratadas con 6-IL (24 hrs) (Fig. 16A).

Proliferación. Células MCF-7 fueron infectadas y tratadas con el antagonista de los PPAR γ GW9262 (0.5 μM) o con 6-IL (10 μM) durante 72 horas. Además de los respectivos controles se incorporó un grupo con tratamiento previo de 2 hrs de

GW9662 y al término de éste el tratamiento de 6-IL (10 μ M), también por 72 hrs. La viabilidad celular se evaluó por el método de exclusión por azul tripano. La figura 15B muestra que no hubo cambios significativos entre las células control sin infectar y las infectadas (AdGFP y AdPPAR γ tratadas con GW9662). En contraste el grupo sin infección tratado con 6-IL redujo significativamente el número de células viables y este efecto se intensificó en las células infectadas, sin embargo, cuando las células infectadas fueron tratadas previamente con el antagonista GW9662, el efecto antiproliferativo se revierte, si bien no a niveles comparados con los controles, sí de manera significativa cuando se compara con el grupo infectado y tratado con 6-IL (Fig. 16B).

Apoptosis. Con respecto a la apoptosis, el grupo control no infectado (Ctrl) y los grupos control infectados (Ctrl AdGFP y Ctrl AdPPAR γ) no muestran cambios entre ellos en cuanto al porcentaje de apoptosis basal. Cuando el grupo experimental no infectado es tratado con 6-IL (10 μ M) se induce un aumento significativo de apoptosis, el cual se duplica en las células con sobreexpresión de PPAR γ (AdPPAR γ +6-IL), estos efectos se previenen cuando los grupos son pre tratados con GW9662 (GW+6-IL y AdPPAR γ +GW+6-IL) (Fig. 16C).

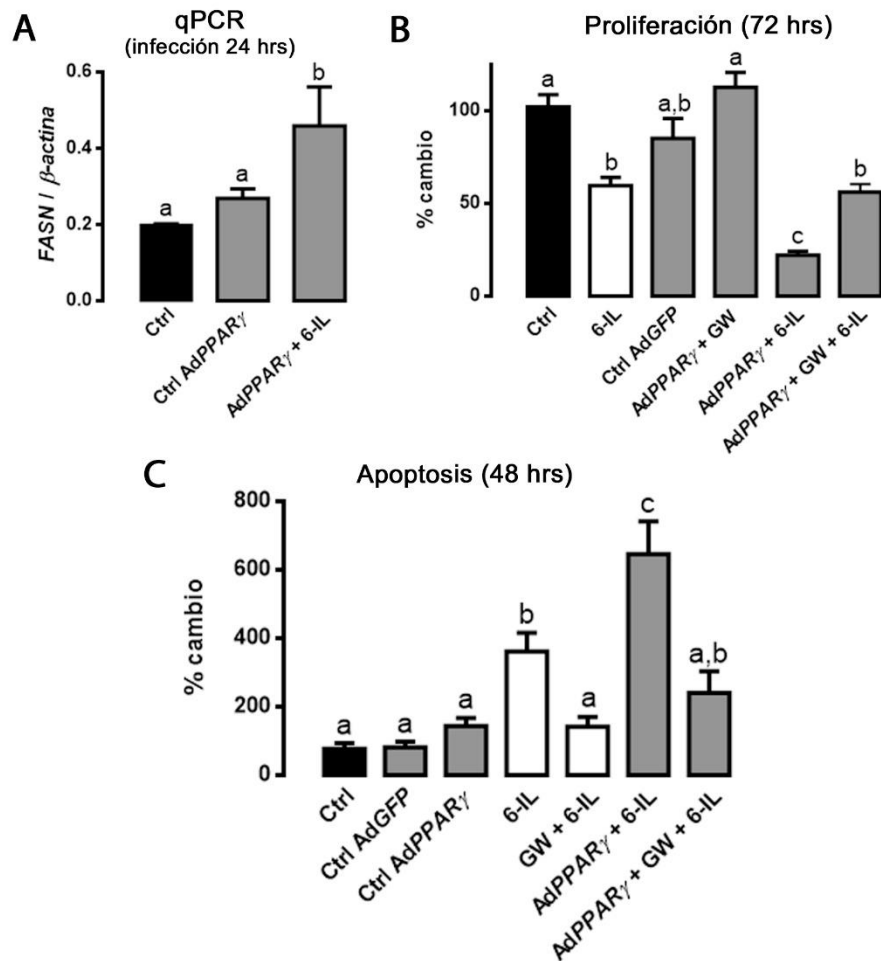


Figura 16. La sobreexpresión de los PPAR γ intensifica los efectos antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL, pero éstos se previenen cuando se administra el GW9662. A. Evaluación de la expresión de *FASN* mediante qPCR en células MCF-7 no infectadas (Ctrl) e infectadas (AdPPAR γ) con vectores adenovirales con el inserto de *PPAR γ* (MOI 50, 24 hrs) uno de los grupos fue tratado con 6-IL (10 μ M) (AdPPAR γ +6IL), la expresión se normalizó mediante el gen constitutivo β -actina. **B.** Células sin y con sobreexpresión de *PPAR γ* (AdPPAR γ) fueron tratadas con 10 μ M de 6-IL (6-IL) y se incorporaron 2 grupos de infección control (Ctrl AdGFP y Ctrl AdPPAR γ +GW [tratamiento de GW9662 0.5 μ M]). También se evaluó un grupo con pretratamiento de GW9662 (AdPPAR γ +GW+6-IL) y el respectivo grupo no infectado control para todo el experimento (Ctrl). Se evaluó la proliferación a 72 hrs mediante el ensayo de exclusión por azul de tripano. **C.** Se evaluó la apoptosis a través de identificación de fosfatidilserina por citometría de flujo. Tres grupos control sin tratar (Ctrl, Ctrl AdGFP y Ctrl AdPPAR γ) y cuatro grupos experimentales (6-IL 10 μ M y con pretratamiento con GW9662), sin y con sobreexpresión (AdPPAR γ) fueron evaluados. Los datos son expresados como media \pm DS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($P < 0.05$) ($n=4$).

El silenciamiento de la expresión de los PPAR γ bloquea el efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL

Proliferación. Células MCF-7 transfectadas establemente con un plásmido que codifica para un RNA de interferencia dirigido contra los PPAR γ (Fig. 9), fueron tratadas con 6-IL (10 μ M) durante 96 hrs. La figura 17A muestra que el silenciamiento de los PPAR γ inhibe el efecto antiproliferativo de la 6-IL (RNAi 6-IL), en contraste, las células tratadas sin transfectar (WT 6IL) y las células control del RNAi (Scramble 6-IL) si muestran un efecto antiproliferativo de la 6-IL comparado con sus controles (WT Ctrl y Scramble Ctrl respectivamente). Interesantemente, las células con silenciamiento (RNAi Ctrl y RNAi 6-IL) presentan una proliferación mayor que los grupos control (WT Ctrl y Scramble Ctrl).

Apoptosis. El silenciamiento de los PPAR γ también inhibió el ya descrito efecto apoptótico de la 6-IL (RNAi 6-IL) (Fig. 17B), pero se mantuvo como era de esperarse, en el grupo no transfectado (6-IL) y en el control del RNAi (Scramble 6-IL).

La 6-IL inhibe la migración de células MCF-7, sin embargo, este efecto se ve bloqueado cuando hay silenciamiento de los PPAR γ

Células MCF-7 RNAi-PPAR γ , MCF-7 Scramble-PPAR γ y MCF-7 WT fueron tratadas durante 24 hrs con 6-IL (10 μ M) o su vehículo (etanol) y se evaluó su capacidad de migración a través de ensayos de cierre de herida (Fig. 18). Tanto las células MCF-7 Scramble-PPAR γ como las WT tratadas con 6-IL vieron reducida su capacidad de migración en cerca de un 60%, sin embargo, las células MCF-7 RNAi-PPAR γ fueron insensibles al efecto de la 6-IL.

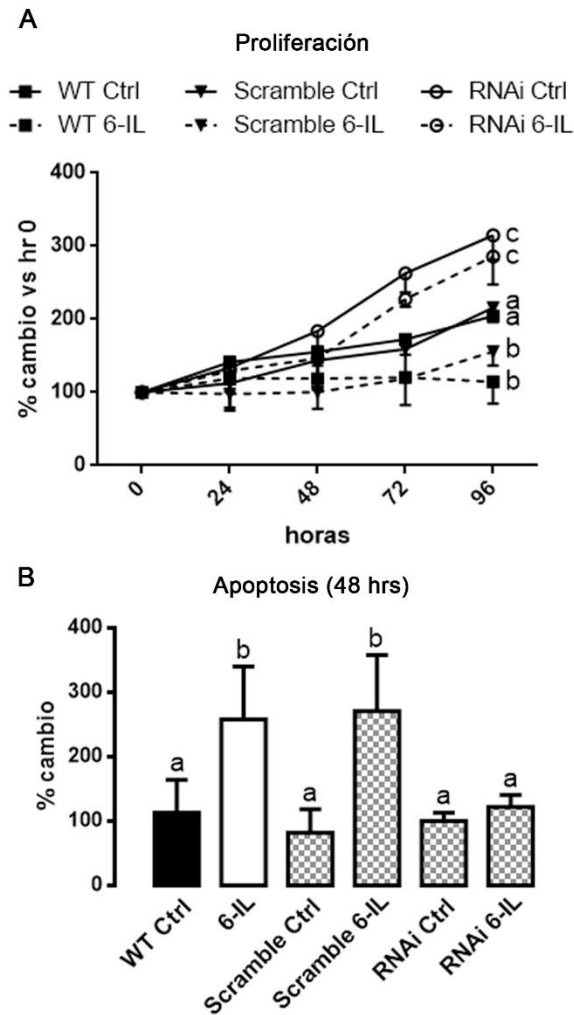


Figura 17. El silenciamiento de los PPAR γ bloquea los efectos de la 6-IL. A. Células MCF-7 transfectadas establemente con un plásmido que codifica para un RNA de interferencia dirigido contra PPAR γ (RNAi), su control de transfección (Scramble) y células no transfectadas (WT) fueron tratadas con 6-IL (10 μ M) (con su respectivo grupo control) durante 96 hrs, evaluando su proliferación cada 24 hrs mediante el ensayo de azul de tripano. **B.** Sobre estos mismos grupos tratados igualmente con 6-IL durante 48 hrs, se evaluó la inducción de apoptosis por citometría de flujo. Los resultados son expresados como porcentaje de cambio con respecto al control y se presenta la media \pm DS ($n=3$). Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($P<0.05$).

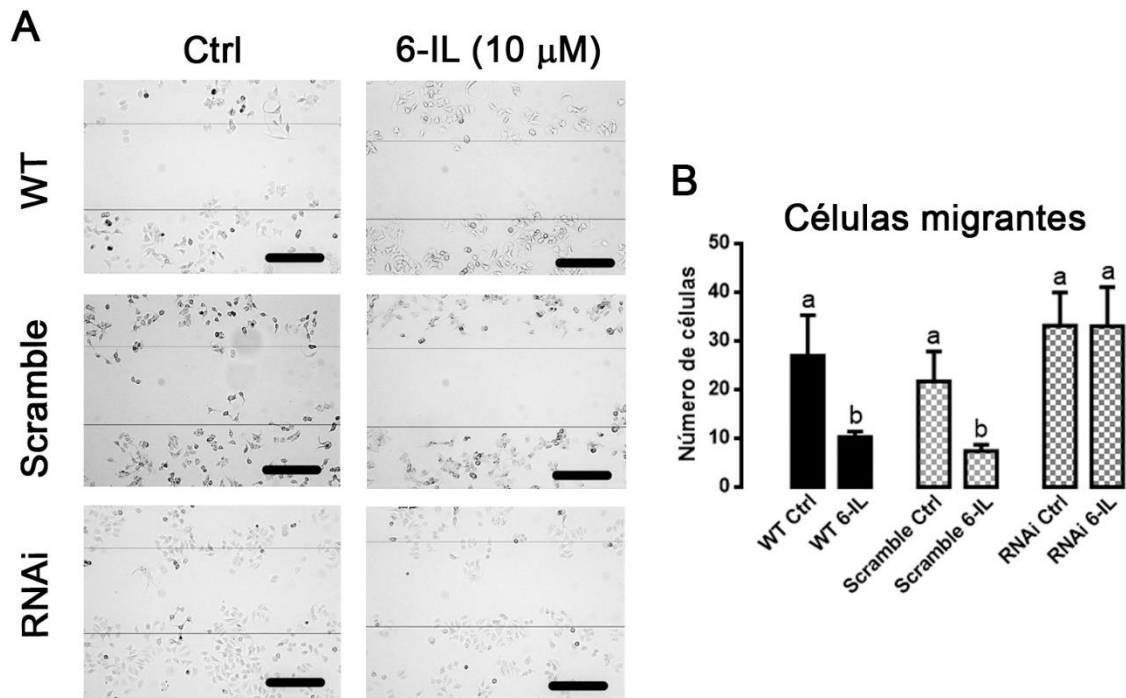


Figura 18. La 6-IL inhibe la migración de células MCF-7, sin embargo, este fenómeno es revertido por el silenciamiento de los PPAR γ . **A.** Paneles representativos de los ensayos de cierre de herida mediante los cuales se evaluó la migración de células MCF-7 RNAi-PPAR γ , MCF-7 Scramble-PPAR γ y MCF-7 WT, dichas células fueron tratadas durante 24 hrs con 6-IL o etanol (Ctrl) (contraste de fases, magnificación 10X, barra de escala 200 μ m, promedio de la herida 377 μ m). **B.** Gráfica de barras en la que se muestran los resultados completos de los ensayos de cierre de herida. Los datos son expresados como la media del número de células migrantes \pm DS ($n=3$). Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías y una prueba de Tukey múltiple para la comparación entre grupos. Las letras distintas indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$)

6-IL no activa la vía extrínseca de la apoptosis

Para evaluar si la 6-IL o el I₂ eran capaces de activar la vía extrínseca de la apoptosis, se exploró la posible activación de caspasa 8 en células MCF-7 WT tratadas con estos compuestos (10 μ M y 200 μ M respectivamente). La figura 19 muestra que no hubo cambios entre los grupos tratados y el grupo control.

Actividad de Caspasa-8

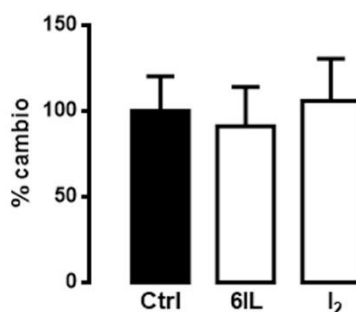


Figura 19. La vía extrínseca de la apoptosis no está involucrada en la inducción de dicho fenómeno ni por la 6-IL, ni por el I₂. 5X10⁶ células MCF-7 fueron tratadas con 6-IL (10 μ M), I₂ (200 μ M) o vehículo (etanol + agua desionizada) (Ctrl) durante 48 hrs, al final de este tiempo se evaluó la actividad de caspasa 8 mediante un ensayo colorimétrico, los resultados fueron normalizados por la cantidad de proteína. Los datos son expresados como media \pm DS ($n=3$).

DISCUSIÓN

Existen diversos estudios experimentales (Eskin et al. 1995; Funahashi et al. 1996; García-Solís et al. 2005; Soriano et al. 2011; Alfaro et al. 2013), abordajes epidemiológicos (Cann et al. 2000; Venturi et al. 2000; Venturi 2001) y ensayos clínicos (Ghent et al. 1993; Kessler 2004; Anguiano et al. 2010; Peralta et al. 2011) que muestran que el I₂ tiene un efecto inhibitor sobre procesos hiperplásicos, inflamatorios y neoplásicos. La manera en cómo se llevan a cabo estos mecanismos aún se está estudiando, sin embargo, como se mencionó en los antecedentes, nuestro grupo de trabajo ha propuesto la participación de la 6-IL como la molécula intermediaria de una parte importante de dichos efectos.

En este proyecto se demostró que las células neoplásicas mamarias MCF-7 contienen 2 veces más cantidad de AA (el cual sirve de sustrato para la formación de 6-IL) que las células normales (MCF-12F). Estos resultados son consistentes con otros reportes que describen altas concentraciones de este ácido graso en varios cánceres incluyendo el de mama (Hilf et al. 1969; Rillema & Mulder 1978; Wicha et al. 1979; Rolland et al. 1980b). La abundancia en AA se ha interpretado como una ventaja para las células neoplásicas, debido a que el AA es un compuesto indispensable para la formación de fosfolípidos y estos a su vez fuente para la biosíntesis de nuevas membranas en células con una alta tasa de replicación (Swinnen et al. 2003; Baron et al. 2004). Además de ello el AA es sustrato para la formación de prostaglandinas, las cuales entre otros efectos, incrementan la proliferación celular e inducen la expresión de metaloproteasas involucradas en procesos de invasión y metástasis (Wicha et al. 1979; Rolland et al. 1980a; 1980b). El incremento en las concentraciones de AA en células neoplásicas nos ha permitido proponer, que la elevada formación de 6-IL es el resultado de la abundante disponibilidad del sustrato y la explicación a la mayor sensibilidad al yodo que presentan las células tumorales versus las normales (Arroyo-Helguera et al. 2008).

Por otro lado, se realizaron modificaciones al método tradicional de síntesis de compuestos yodados a partir de AA, con el objetivo de obtener yodolactonas en

mayor cantidad y más puras. La modificación metodológica realizada en este trabajo permitió separar ambas yodolactonas mostrando claramente tiempos de retención en cromatografía de gases distintivos para cada pico y su respectivo patrón de fragmentación. Aparentemente el proceso de extracción en el método tradicional causa la pérdida sustancial de 6-IL, lo cual es consistente con lo reportado previamente (Monteagudo et al. 1990). La separación directa del producto crudo por TLC preserva la 6-IL y permite su separación cromatografía de la 14-IL (Fig. 11). Adicionalmente a estos resultados se exploró su efecto sobre células de cáncer mamario, si bien la 14-IL no ha sido identificada *in vivo*, si ha mostrado tener efectos antiproliferativos tanto *in vitro* (Pisarev et al. 1992b) como *in vivo* (Pisarev et al. 1994) sobre tejido tiroideo, por lo cual nos pareció pertinente conocer si era capaz de reproducir los efectos en células mamarias. Nuestros resultados mostraron que la 14-IL también presenta efectos antiproliferativos y apoptóticos en células MCF-7 y que la coadministración de 6-IL y 14-IL exhibe un comportamiento aditivo. (Fig. 12C). Además el efecto de la 14-IL se bloquea cuando se emplea el antagonista GW9662 de los PPAR γ (Fig. 15), lo que sugiere que podrían utilizar el mismo mecanismo de acción, colocando a la 14-IL como otro compuesto yodado con potencial terapéutico.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado a través de ensayos de retardo (EMSA) que la 6-IL es capaz de formar complejos con los isotipos de PPAR (Nuñez-Anita et al. 2009) y que esta interacción es capaz de activar el elemento de respuesta de PPARs (mediante ensayos de transactivación con el gen reportero luciferasa), lo que indica que la 6-IL es un ligando funcional. Además, también se mostró que las células MCF-7 acumulan lípidos si son tratadas con 6-IL, de manera semejante a la obtenida a través del tratamiento con rosiglitazona, un agonista sintético de alta afinidad para los PPAR γ . En este sentido, la activación de la capacidad adipogénica de las células MCF-7 se ha interpretado como un proceso de re-diferenciación (Mueller et al., 1998). En el presente estudio demostramos que el tratamiento con 6-IL en células que sobreexpresan PPAR γ provoca un aumento significativo de la expresión de sintasa

de ácidos grasos (*FASN*), un gen que se encuentra regulado por los PPAR γ (Bogacka et al. 2004; Kadegowda et al. 2009). Se ha postulado que el compromiso hacia un linaje celular somete a las células a un estado quiescente (von Wagenheim & Peterson 1998; Coffman & Studzinski 1999); así, dicha vía de re-diferenciación podría confluir en el efecto antiproliferativo de la 6-IL.

Un aporte sustancial de este trabajo fue la evidencia de que la activación de los PPAR γ es crucial para que la 6-IL pueda ejercer sus efectos antiproliferativos y apoptóticos. Esta aseveración se demostró mediante el uso de un antagonista altamente selectivo (GW9662) de PPAR γ el cual se empleó para bloquear los receptores endógenos (Fig. 14) y también en un sistema de sobreexpresión de PPAR γ por vectores adenovirales (Fig. 16). En ambos casos los efectos antitumorales de la 6-IL sobre células MCF-7 fueron inhibidos con dicho antagonista. Esta observación fue confirmada con la generación de una línea celular con expresión estable de un RNA de interferencia, el cual provocaba el silenciamiento de los PPAR γ . En este modelo experimental las células fueron insensibles a los efectos de la 6-IL (Fig. 17). Este hallazgo confirmó la participación de los PPAR γ en el efecto antitumoral de la 6-IL. Un dato sobresaliente fue que las células con silenciamiento de PPAR γ presentan una proliferación mayor que las células control (WT y Scramble), este comportamiento también ha sido reportado en células de linfomas tipo Burkitt con inmunofenotipo B (Garcia-Bates et al. 2009), indicando que la ausencia de PPAR γ permite el escape de las células hacia fenotipos altamente replicantes.

Por otro lado, la motilidad es una característica determinante en las células cancerosas y este trabajo demostró por primera vez que la 6-IL disminuye de manera significativa la capacidad de migración de las células neoplásicas MCF-7 (Fig. 18). La inhibición de la migración e invasión por la activación de los PPAR γ ha sido reportada en líneas celulares de cáncer de pulmón (Reka et al. 2010), próstata (Qin et al. 2014), glioblastoma y melanoma (Papi et al. 2009) y células de cáncer de mama (Woo et al. 2011). En las células de pulmón se propone a la activación de los PPAR γ como generador de un efecto antagónico de la transición

epitelio-mesenchima mediada por TGF β /Smad3. Es decir, mantiene un estado diferenciado de las células (con expresión de moléculas de unión intercelular como E-cadherina), lo que evita que expresen moléculas que participan en la migración (vimentina, N-cadherina y fibronectina). En el caso de las células de próstata se ha propuesto que se debe a una represión dependiente de PPAR γ de la expresión del receptor C-X-C para quimocinas tipo 4 (CXCR4), el cual es parte del eje CXCR4/CXCL12 (quimocina C-X-C ligando 12) que a su vez se encuentra involucrado en los procesos de migración, invasión y metástasis al generar una reorganización del citoesqueleto y expresión de proteínas de adhesión célula-matriz de tipo integrinas (Domanska et al. 2013). En el caso de las líneas celulares de glioblastoma, melanoma y de cáncer de mama, no se describe el mecanismo celular, pero se demuestra un efecto inhibitorio sobre la migración e invasividad mediada por PPAR γ . En nuestro caso, el efecto inhibitorio de la 6-IL sobre la migración en las células control (WT y Scramble) es significativo, pues alcanza alrededor de un 60% de inhibición y la participación de los PPAR γ es determinante, pues las células con silenciamiento de PPAR γ son insensibles al efecto de la 6-IL. Falta abordar si también estarían alterados los mecanismos de invasión, por ejemplo el bloqueo de la activación de metaloproteasas descrito en otros trabajos (Burrage et al. 2008; Reka et al. 2010), o si la activación de PPAR jugaría un papel semejante a los descritos arriba (antagonismo de TGF/Smad3 o represión de CXCR4).

Finalmente, se ha descrito que el I₂ o la 6-IL inducen apoptosis mediante dos vías: AIF/PARP1 y Bax-Caspasas (Shrivastava et al. 2006; Arroyo-Helguera et al. 2008). Hace algunos años se reportó que los PPAR γ eran capaces de activar el promotor del gen de *FasL* (Bonofiglio et al. 2009) y por lo tanto activar la vía extrínseca de apoptosis en células MCF-7. Esta observación ha sido reforzada recientemente por hallazgos semejantes en células humanas de cáncer colorrectal (Yao et al. 2013). En éste trabajo exploramos si la vía extrínseca de la apoptosis está involucrada en el efecto apoptótico del I₂ y la 6-IL; nuestros resultados muestran que la actividad de caspasa-8 no se ve alterada cuando las células son

tratadas con alguno de los dos compuestos (Fig. 19), por lo tanto podemos inferir que el efecto apoptótico de éstos compuestos yodados está mediado de manera exclusiva por vías intrínsecas.

CONCLUSIONES

En este proyecto se demostraron las siguientes aseveraciones:

- Las células neoplásicas mamarias MCF-7 contienen mayor cantidad de AA que las células de fenotipo normal (MCF-12).
- La 14-IL tiene efecto antiproliferativo y apoptótico de forma semejante a la 6-IL; cuando ambos compuestos son co-administrados sus efectos son aditivos.
- La 14-IL podría estar empleando la misma vía que la 6-IL (activación de los PPAR γ) para llevar a cabo sus efectos antitumorales, o al menos en la inducción de apoptosis.
- La inducción de la expresión de *FASN* fortalece observaciones previas de que la 6-IL puede ejercer efectos diferenciadores.
- La activación de los PPAR γ es necesaria para que la 6-IL genere efectos antiproliferativos y apoptóticos
- La 6-IL inhibe la migración celular y este fenómeno también podría estar mediado por los PPAR γ .
- La inducción de apoptosis generada por la 6-IL y/o el I₂ se restringe a mecanismos intracelulares.

Todos estos resultados refuerzan la noción de que la 6-IL es un intermediario factible de los efectos del I₂ y apoyan la propuesta de que este ion puede ser un coadyuvante en el tratamiento de neoplasias de tejidos capaces de captar yodo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aceves, C. et al., 2009. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Mol Cancer*, 8(1), p.33.
- Aceves, C., Anguiano, B. & Delgado, G., 2005. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10, pp.189–196.
- Alfaro, Y. et al., 2013. Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Mol Cancer*, 12(1), p.45.
- Anguiano, B. et al., 2010. Therapeutic effect of iodine on benign human prostatic hyperplasia. En *14th International Thyroid Congress*. Paris, Francia, p. P-0051.
- Anguiano, B. & Aceves, C., 2011. Iodine in Mammary and Prostate Pathologies. *Curr Chem Biol*, 5(3), pp.177–182.
- Aranda, N. et al., 2013. Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in differentiated and undifferentiated human prostate cancer cell lines. *Prostate*, 73(1), pp.31–41.
- Arroyo-Helguera, O. et al., 2008. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer*, 15(4), pp.1003–1011.
- Arroyo-Helguera, O. et al., 2006. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer*, 13(4), pp.1147–1158.
- Badawi, A.F. et al., 2004. Inhibition of rat mammary gland carcinogenesis by simultaneous targeting of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Res*, 64(3), pp.1181–9.
- Baron, A. et al., 2004. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*, 91(1), pp.47–53.
- Berger, J. & Moller, D.E., 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53, pp.409–435.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), pp.911–917.
- Bocca, C. et al., 2007. Involvement of PPAR gamma and E-cadherin/beta-catenin pathway in the antiproliferative effect of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells. *Int J Cancer*, 121(2), pp.248–56.
- Boeynaems, J.M. & Hubbard, W., 1980. Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by the rat thyroid. *J Biol Chem*, 255(19), pp.9001–9004.
- Bogacka, I. et al., 2004. The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo. *Diabetes Care*, 27(7), pp.1660–7.
- Bonofiglio, D. et al., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activates fas ligand gene promoter inducing apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 113(3), pp.423–434.
- Burrage, P.S. et al., 2008. Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists cooperate to inhibit matrix metalloproteinase gene expression. *Arthritis Res Ther*, 10(6), p.R139.
- Cann, S.A. et al., 2000. Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control*, 11(2), pp.121–7.
- Carrasco, N., 1993. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta*, 1154(1), pp.65–82.
- Chazenbalk, G.D. et al., 1988. Thyroid autoregulation. Inhibitory effects of iodinated derivatives of

- arachidonic acid on iodine metabolism. *Prostaglandins*, 36(2), pp.163–172.
- Coffman, F.D. & Studzinski, G.P., 1999. Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication. *Exp Cell Res*, 248(1), pp.58–73.
- Domanska, U.M. et al., 2013. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *Eur J Cancer*, 49(1), pp.219–230.
- Dreyer, C. et al., 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 68(5), pp.879–87.
- Dugrillon, A. et al., 1990. Evidence that an iodolactone mediates the inhibitory effect of iodide on thyroid cell proliferation but not on adenosine 3',5'-monophosphate formation. *Endocrinology*, 127(1), pp.337–343.
- Dugrillon, A. et al., 1994. Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Horm Metab Res*, 26(10), pp.465–469.
- Ehrmann, J. et al., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Rep*, 146(2), pp.11–4.
- Elstner, E. et al., 1998. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), pp.8806–8811.
- Elston, C.W. & Ellis, I.O., 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), pp.403–10.
- Eskin, B.A. et al., 1995. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biol Trace Elem Res*, 49, pp.9–19.
- Ferlay, J. et al., 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6), pp.1374–403.
- Ferlay, J. et al., 2014. GLOBOCAN 2012 v1.1, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. *International Agency for Research on Cancer*. Available at: <http://globocan.iarc.fr/> [Fecha de acceso enero 1, 2016].
- Frkovic-Grazio, S. & Bracko, M., 2002. Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol*, 55(2), pp.88–92.
- Funahashi, H. et al., 1996. Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *J Surg Oncol*, 61(3), p.5.
- Garcia-Bates, T.M. et al., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression and knockdown: impact on human B cell lymphoma proliferation and survival. *Cancer Immunol Immunother*, 58(7), pp.1071–83.
- García-Solís, P. et al., 2005. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide (I⁻) treatment Evidence that I₂ prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocrinol*, 236(1-2), pp.49–57.
- Ghent, W.R. et al., 1993. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Can J Surg*, 36(5), pp.453–460.
- Gimble, J.M. et al., 1998. Expression of peroxisome proliferator activated receptor mRNA in normal and tumorigenic rodent mammary glands. *Biochem Biophys Res Commun*, 253, pp.813–7.
- Ha, H.J., Lee, S.Y. & Park, Y.S., 2000. Stereocontrolled Iodolactonization of Acyclic Olefinic Amides. *Synth Commun*, 30(20), pp.3645–3650.
- Hassiotou, F. & Geddes, D., 2013. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat*, 26(1), pp.29–48.
- Hilf, R. et al., 1969. Biochemical characteristics of mammary glands and mammary tumors of rats

- induced by 3-methylcholanthrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res*, 29(5), pp.977–988.
- Howlader, N. et al., 2015. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012*, Bethesda, MD.
- INEGI, 2015. *Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)*, Aguascalientes, AGS.
- Inman, J.L. et al., 2015. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*, 142(6), pp.1028–42.
- Inumaru, L.E., da Silveira, E.A. & Naves, M.M.V., 2011. Risk and protective factors for breast cancer: a systematic review. *Cad Saude Publica*, 27(7), pp.1259–70.
- Issemann, I. & Green, S., 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294), pp.645–650.
- Kadegowda, A.K.G. et al., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *J Dairy Sci*, 92(9), pp.4276–89.
- Kersten, S., Desvergne, B. & Wahli, W., 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405(6785), pp.421–4.
- Kessler, J.H., 2004. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *Breast J*, 10(4), pp.328–336.
- Knaul, F.M. et al., 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Publica Mex*, 51(2), pp.335–344.
- Kota, B.P., Huang, T.H.W. & Roufogalis, B.D., 2005. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*, 51(2), pp.85–94.
- Krey, G. et al., 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, 11, pp.779–91.
- Kumar, V., Abbas, A.K. & Aster, J.C., 2015. *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional 9a ed.* A. J. Kumar V, Abbas AK, ed., Elsevier.
- Küpper, F.C. et al., 1998. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta*, 207(2), pp.163–171.
- Lacroix, L., 2004. Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters. *J Clin Endocrinol Metabol*, 89(3), pp.1423–1428.
- Lakhani, S.R. et al., 2012. *WHO Classification of tumours of the breast 4th ed.* IARC, ed., Lyon, France: IARC Press.
- Leesnitzer, L.M. et al., 2002. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*, 41(21), pp.6640–50.
- Maggiara, M. et al., 2004. An overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. *Int J Cancer*, 112(6), pp.909–19.
- Maskarinec, G. & Noh, J., 2004. The effect of migration on cancer incidence among Japanese in Hawaii. *Ethn Dis*, 14(3), pp.431–439.
- Mehta, R.G. et al., 2000. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer Inst*, 92(5), pp.418–23.
- Michalik, L., Desvergne, B. & Wahli, W., 2004. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*, 4(1), pp.61–70.
- Miller W.D., 2006. Extrathyroidal benefits of iodine. *J Amer Phys Surg*, 11, pp.106–110.
- Mohar, A. et al., 2015. Cáncer de mama en el Instituto Nacional de Cancerología. Experiencia del

- Seguro Popular 2007-2013. *Rev Mex Mastol*, 5(1), pp.6–11.
- Monteagudo, E.S. et al., 1990. Synthesis and characterization of iodinated derivatives of arachidonic acid. *An Asoc Quím Argent*, 78(1), pp.31–36.
- Mueller, E. et al., 1998. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*, 1(3), pp.465–470.
- Mustafa, A. & Kruger, W.D., 2008. Suppression of tumor formation by a cyclooxygenase-2 inhibitor and a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist in an in vivo mouse model of spontaneous breast cancer. *Clin Cancer Res*, 14(15), pp.4935–42.
- Nagataki, S., 2008. The average of dietary iodine intake due to the ingestion of seaweeds is 1.2 mg/day in Japan. *Thyroid*, 18(6), pp.667–8.
- Nava-Villalba, M. & Aceves, C., 2014. 6-Iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 112C, pp.27–33.
- Nuñez-Anita, R.E. et al., 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(1-2), pp.34–42.
- Olvera-Caltzontzin, P. et al., 2013. Iodine uptake and prostate cancer in the TRAMP mouse model. *Mol Med*, 19, pp.409–16.
- Papadaki, I. et al., 2005. PPARgamma expression in breast cancer: clinical value and correlation with ERbeta. *Histopathology*, 46(1), pp.37–42.
- Papi, A. et al., 2009. Enhanced effects of PPAR γ ligands and RXR selective retinoids in combination to inhibit migration and invasiveness in cancer cells. *Oncol Rep*, 21(4), pp.1083–1089.
- Peralta, G. et al., 2011. Iodine exhibits dual effects on breast cancer as a co-treatment with anthracyclines: anti-neoplastic synergy and cardioprotector. En *102nd Annual Meeting, AACR*. Orlando, Florida: AACR, p. 3509/16.
- Pérez-Solis, M.A. et al., 2016. Effects of the lifestyle habits in breast cancer transcriptional regulation. *Cancer Cell Int*, 16(1), p.7.
- Pighetti, G.M. et al., 2001. Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res*, 21(2A), pp.825–9.
- Pisarev, M.A. et al., 1992a. Further studies on the antigoirogenic action of iodoarachidonates. *Thyroidology*, 4(1), pp.27–29.
- Pisarev, M.A. et al., 1992b. Effect of iodoarachidonates on thyroid FRTL-5 cells growth. *Horm Metab Res*, 24(12), pp.558–561.
- Pisarev, M.A. et al., 1994. Studies on the goiter inhibiting action of iodolactones. *Eur J Pharmacol*, 258(1-2), pp.33–37.
- Qin, L. et al., 2014. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist rosiglitazone inhibits migration and invasion of prostate cancer cells through inhibition of the CXCR4/CXCL12 axis. *Mol Med Rep*, 10(2), pp.695–700.
- Rakha, E.A. et al., 2008. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 26(19), pp.3153–8.
- Reka, A.K. et al., 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer Ther*, 9(12), pp.3221–32.
- Reynolds, P., 2013. Smoking and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 18(1), pp.15–23.
- Rillema, J.A. & Hill, M., 2003a. Prolactin regulation of the pendrin-iodide transporter in the mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(1), pp.E25–8.

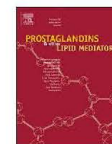
- Rillema, J.A. & Hill, M., 2003b. Pendrin transporter carries out iodide uptake into MCF-7 human mammary cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228(9), pp.1078–1082.
- Rillema, J.A. & Mulder, J.A., 1978. Arachidonic acid distribution in lipids of mammary glands and DMBA-induced tumors of rats. *Prostaglandins Med*, 1(1), pp.31–38.
- Rizo-Ríos, P. et al., 2015. Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evid Med Invest Salud*, 8(1), pp.5–15.
- Roberts-Thomson, S.J. & Snyderwine, E.G., 2000. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in normal rat mammary gland and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine-induced mammary gland tumors from rats fed high and low fat diets. *Toxicol Lett*, 118(1-2), pp.79–86.
- Rolland, P.H. et al., 1980a. Prostaglandin in human breast cancer: evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst*, 64(5), pp.1061–1070.
- Rolland, P.H. et al., 1980b. Prostaglandin production and metabolism in human breast cancer. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*, 6, pp.575–580.
- Saika, K. & Sobue, T., 2009. Epidemiology of breast cancer in Japan and the US. *Japan Med Assoc J*, 52(1), pp.39–44.
- Seargent, J.M., Yates, E. a & Gill, J.H., 2004. GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol*, 143(8), pp.933–7.
- Shrivastava, A. et al., 2006. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *J Biol Chem*, 281(28), pp.19762–71.
- Soriano, O. et al., 2011. Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors: association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocr Relat Cancer*, 18(4), pp.529–39.
- Sosa-Durán, E.E. & García-Rodríguez, F.M., 2013. Panorama epidemiológico del cáncer en México. *Rev Mex Anest*, 36(S1), pp.130–132.
- Suchanek, K.M. et al., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog*, 34(4), pp.165–171.
- Suh, N. et al., 1999. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res*, 59, pp.5671–3.
- Swinnen, J.V. et al., 2003. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*, 302(4), pp.898–903.
- Teas, J. et al., 2004. Variability of iodine content in common commercially available edible seaweeds. *Thyroid*, 14(10), pp.836–41.
- Turk, J. et al., 1983. Iodination of arachidonic acid mediated by eosinophil peroxidase, myeloperoxidase and lactoperoxidase. Identification and comparison of products. *Biochim Biophys Acta*, 751(2), pp.189–200.
- Vara-Salazar, E.D. et al., 2011. Tendencias de la mortalidad por cáncer de mama en México, 1980-2009. *Salud Publica Mex*, 53(5), pp.385–393.
- Vega-Riveroll, L. et al., 2010. Impaired nuclear translocation of estrogen receptor alfa could be associated with the antineoplastic effect of iodine in premenopausal breast cancer. En *33rd Annual CRTC-AARC San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS)*. San Antonio, TX: American Association for Cancer Research, p. P6 14–15.

- Venturi, S., 2001. Is there a role for iodine in breast diseases? *Breast*, 10, pp.379–82.
- Venturi, S. et al., 2000. Role of iodine in evolution and carcinogenesis of thyroid, breast and stomach. *Adv Clin Path*, 4, pp.11–7.
- von Wagenheim, K.H. & Peterson, H.P., 1998. Control of Cell Proliferation by Progress in Differentiation: Clues to Mechanisms of Aging, Cancer Causation and Therapy. *J Theor Biol*, 193(4), pp.663–678.
- Wicha, M.S., Liotta, L.A. & Kidwell, W.R., 1979. Effects of free fatty acids on the growth of normal and neoplastic rat mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 39(2 Pt 1), pp.426–435.
- Woo, C.C. et al., 2011. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPARG pathway. *Biochem Pharmacol*, 82(5), pp.464–475.
- Xin, X. et al., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 274(13), pp.9116–21.
- Yao, Y. et al., 2013. SERPINA3K induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activating the Fas/FasL/caspase-8 signaling pathway. *FEBS J*, 280(14), pp.3244–55.
- Yin, F. et al., 2001. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(5), pp.916–922.
- Yin, Y. et al., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res*, 65(9), pp.3950–3957.
- Youlden, D.R. et al., 2014. Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biol Med*, 11(2), pp.101–15.
- Zava, T.T. & Zava, D.T., 2011. Assessment of Japanese iodine intake based on seaweed consumption in Japan: A literature-based analysis. *Thyroid Res*, 4, p.14.
- Ziegler, R.G. et al., 1993. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst*, 85(22), pp.1819–27.



Contents lists available at ScienceDirect

Prostaglandins and Other Lipid Mediators



Minireview

6-Iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine



Mario Nava-Villalba, Carmen Aceves*

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 April 2014

Received in revised form 20 June 2014

Accepted 1 July 2014

Available online 10 July 2014

Keywords:

Apoptosis
Arachidonic acid
Iodine
Iodolipids
Iodocompounds
Mammary cancer

ABSTRACT

An iodinated derivative of arachidonic acid, 5-hydroxy-6-iodo-8,11,14-eicosatrienoic acid, δ -lactone (6-IL) has been implicated as a possible intermediate in the autoregulation of the thyroid gland by iodine. In addition to antiproliferative and apoptotic effects observed in thyrocytes, this iodolipid could also exert similar actions in cells derived from extrathyroidal tissues like mammary gland, prostate, colon, or the nervous system. In mammary cancer (solid tumors or tumor cell lines), 6-IL has been detected after molecular iodine (I_2) supplement, and is a potent activator of peroxisome proliferator-activated receptor type gamma (PPAR γ). These observations led us to propose I_2 supplement as a novel coadjutant therapy which, by inducing differentiation mechanisms, decreases tumor progression and prevents chemoresistance. Some kinds of tumoral cells, in contrast to normal cells, contain high concentrations of arachidonic acid, making the I_2 supplement a potential "magic bullet" that enables local, specific production of 6-IL, which then exerts antineoplastic actions with minimal deleterious effects on normal tissues.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	27
2. Iodolactonization	28
3. Role of iodolipids in thyroid physiology	28
4. Generation and subcellular location of iodolactones	30
5. 6-IL effectors	30
6. Antitumor properties of 6-IL	30
7. Toward clinical application	31
Authors' contributions	32
Conflict of interest	32
Acknowledgments	32
References	32

1. Introduction

Epidemiological studies have shown that moderately high iodine ingestion is a protective factor against mammary and prostate pathologies [1,2]. *In vivo* and *in vitro* studies have provided evidence that molecular iodine (I_2) rather than iodide (I^-) is responsible for these antineoplastic effects, and two molecular paths have been proposed: (1) I_2 exerts a direct effect related to its

oxidant/antioxidant properties, which can dissipate the mitochondrial membrane potential thereby triggering mitochondrion-mediated apoptosis [3], and/or I_2 functions as a scavenger and protective antioxidant neutralizing HO^{\bullet} radicals [4], and (2) I_2 exerts an indirect effect through iodolipid formation and the activation of peroxisome proliferator-activated receptors type gamma (PPAR γ) which, in turn, trigger apoptotic or differentiation pathways. Here, we review these latter mechanisms that involve the formation of iodo-lactone.

Unsaturated fatty acids (UFAs), in addition to being structural components of biomembranes, are metabolized to reactive products and exert a crucial role in several physio- and pathological processes [5]. Many UFA-derivatives, especially the lactones, can act at different cellular levels, functioning as substrates of

* Corresponding author at: Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, CP 76230, Mexico. Tel.: +52 442 2381067; fax: +52 442 2381067.

E-mail addresses: marionava23@unam.mx (M. Nava-Villalba), caracev@unam.mx (C. Aceves).

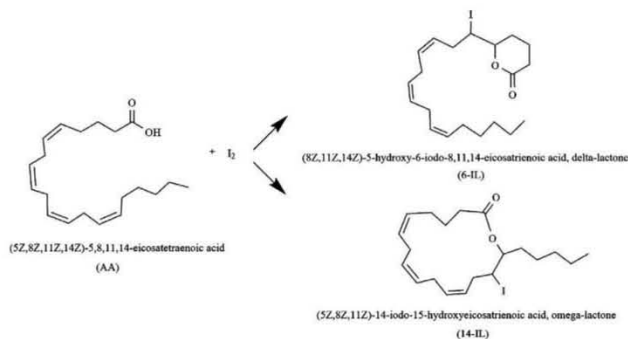


Fig. 1. Chemical structure of iodolactones. The reaction involves the formation from molecular iodine of a positively charged halonium ion at the C-6 or C-14 position of arachidonic acid and the subsequent ring closure by a hydroxyl group at C-5 or C-13 to form the corresponding lactone.

intercellular mediators and also exerting significant intracellular impacts on gene expression and metabolic responses [6–8]. In the thyroid gland, certain iodinated lactones participate in modulating mechanisms that were attributed previously to iodine but could not be explained by thyroid hormone actions. The recent demonstration that some of these iodolactones have effects and can be generated in extrathyroid tissues like mammary gland, may help explain the pleiotropic effects associated with deficient or excess iodine. We propose that I_2 supplement can be used as adjunctive therapy that may be a new “magic bullet” against several cancers capable of iodine uptake.

2. Iodolactonization

Iodolactonization is one of a group of chemical reactions called halo-cyclization, which was described at the beginning of 20th century employing bromine [9]. Shortly thereafter, from 1904 to 1908, Bougault reported iodolactonization as an organic reaction that produces a lactone ring through the addition of oxygen and iodine across a carbon-carbon double bond [10–12]. This reaction can be carried out with any alkene, but of particular interest for biology are the iodolactonizations of UFAs. In fact, Corey used this chemical reaction as a key intermediate step to produce prostaglandins [13], and other researchers have used iodolactonization to synthesize compounds with antitumoral activity such as vernomenin and vernolepin [14], or vibrallactone, a pancreatic lipase inhibitor used to treat obesity [15]. Arachidonic acid (AA) is a polyunsaturated, free fatty acid present in membrane phospholipids of all mammalian cells. Pure AA can be iodinated at each of its four double bonds [16]; however, the iodinated products of only the C5,6 and C14,15 double bonds (6-IL and 14-IL respectively) exhibit biological effects [17,18]. The reaction mechanisms involved in the formation of these components begin with the generation of a positively charged halonium ion from molecular iodine at the C-6 or C-14 position of AA; subsequently, the hydroxyl group at C-5 or C-13 is involved in a nucleophilic, intramolecular ring closure that forms the corresponding lactone [19–21]. Iodinated AA derivatives can be obtained enzymatically [16,19], as well as by chemical reactions employing iron/ H_2O_2 /iodide [22] and acetonitrile/iodide systems [23] (Fig. 1).

3. Role of iodolipids in thyroid physiology

Thyroid function can be regulated by iodide; this is a local mechanism with features distinct from those of the major thyroid regulator: the thyroid stimulating hormone (TSH). When the

amount of iodide intake rises above 1 mg/day, iodide ceases to function as a substrate for hormonogenesis, and it is perceived as a homeostatic signal that prevents the installation of thyrotoxicosis [20], a phenomenon called the “Wolff–Chaikoff effect” [24]. This homeostatic regulation is characterized at the molecular level by: (1) inhibition of H_2O_2 generation by dual oxidases, thereby blocking iodide oxidation and organification [24,25]; (2) suppression of sodium-iodide symporter (NIS) expression [26], stopping the entry of iodide and lowering the intracellular iodide concentration; and (3) inhibition of thyroid hormone secretion [27]. In high concentrations of iodide, additional mechanisms are also observed, like reduction of thyroid blood flow [28,29], inhibition of thyroid growth [17,30], and induction of apoptosis [31,32]. Since all these inhibitory effects of iodide can be prevented by blocking iodide uptake with perchlorate (specific inhibitor of NIS) or by inactivating thyroperoxidase (TPO; iodide oxidation enzyme) with methimazole or propylthiouracil, some authors have proposed an iodinated intermediate; this idea has been called the “XI hypothesis” [20,33–35]. A candidate for the iodocompound XI should be formed after an iodide oxidation process and, by itself, it should replicate the inhibitory effects of iodide; a number of candidate molecules have been proposed, but two classes of compounds stand out: iodolipids and iodoaldehydes [20,36,37].

The earliest reports about iodinated components with biological actions in thyroid gland emerged in the 1950s. After incubating subcellular fractions of thyroid tissue, obtained by differential centrifugation, *in vitro* with ^{131}I iodide, Taurog et al. [38] detected an unidentified iodocompound. Although its lipid nature was immediately suspected [39], this was formally confirmed few years later by Vilkki et al. [40] and Mauchamp et al. [41]. During the next two decades it was established that the phospholipids, fatty acids, and neutral lipids could all be iodinated, and it was postulated that these iodocompounds could be intracellular iodide carriers or they could serve as iodine storage for hormone formation [42–44]; later, a strong tendency correlating their presence with hormonogenesis began to emerge [41,45–47]. However, only in 1980 did chemical structures of iodinated lipids with physiological actions start to be characterized through gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Boeynaems et al. [19] first reported the iodolactonization of arachidonic acid (AA): from an incubation of lactoperoxidase with potassium iodide and H_2O_2 , the main product was 5-hydroxy-6-iodo-8,11,14-eicosatrienoic acid, δ -lactone (6-IL). Shortly thereafter, the macrolides 14-iodo-15-hydroxyeicosatrienoic acid, ω -lactone (14-IL) and 15-iodo-14-hydroxyeicosatrienoic acid, ω -lactone were also identified [48]. These compounds exhibit an important

Table 1
Physiological events in thyroid cells that support the existence of an XI molecule.

Effect	2-IHDA	6-IL	14-IL	I-OH-A
Inhibition of iodide uptake	NE	Yes [56,57 ^a]	NE	NE
Inhibition of cAMP generation	Yes [54,55]	No [21,49]	NE	Yes [58]
Inhibition of H ₂ O ₂ generation	Yes [53,59]	Weak [60]	Yes [60]	NE
Inhibition of hormone secretion	No [54]	No [61,62]	No [61,62]	No [60]
Inhibition of NIS mRNA transcription	NE	No [56]	NE	NE
Inhibition of thyroid peroxidase	Yes [59]	NE	NE	NE
Inhibition of glucose and amino acid transport	NE	Yes [56 ^b]	Yes [63]	Yes [63]
Inhibition of proliferation				
cAMP dependent	Yes [53,54]	Weak [64 ^c]	Yes [64]	NE
cAMP independent (EGF → IP ₃)	No [53]	Yes [21,49,65]	NE	NE
Prevention of MMI-induced goiter growth <i>in vivo</i>	Yes [54]	Yes [58,61,62 ^d]	Yes [60–62]	Yes [58]

Abbreviations: 2-IHDA: 2-iodohexadecanal; 6-IL: 5-hydroxy-6-iodo-8,11,14-eicosatrienoic acid, δ -lactone; 14-IL: 14-iodo-15-hydroxyeicosatrienoic acid, ω -lactone; I-OH-A: 14-iodo-15-hydroxy-5,8,11-eicosatrienoic acid; cAMP: cyclic 3',5'-adenosine monophosphate; NE: not explored; NIS: sodium-iodide symporter; mRNA: messenger ribonucleic acid; EGF: epidermal growth factor; IP₃: inositol 1,4,5-triphosphate; MMI: methimazole.

^aThese authors just mention "iodinated derivatives", but they used the protocol that forms predominantly 6-IL. They report a diminution of ³H-uridine incorporation into mRNA without identifying a particular gene.

^bIn this report only glucose transport was studied.

^cAntiproliferative effect of 14-IL is greater than that of 6-IL, and the authors propose the possible participation of the cAMP pathway (by blocking stimulation of forskolin).

^dIn this study, larger doses of 6-IL were necessary to obtain the results.

inhibitory effect on local thyroid growth factors such as basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF) [21,37,49]. Moreover, the antiproliferative effect of 6-IL is not restricted to blocking mitogenic pathways; it can also induce apoptosis. It has been shown that 6-IL triggers apoptotic mechanisms

in both thyroid follicular cells and in malignant thyroid epithelial cells, based on morphological features observed by electron microscopy [50] and disruption of the mitochondrial potential [51], respectively. Among the iodoaldehydes, 2-iodohexadecanal is the most analyzed; this compound is produced from iodination of

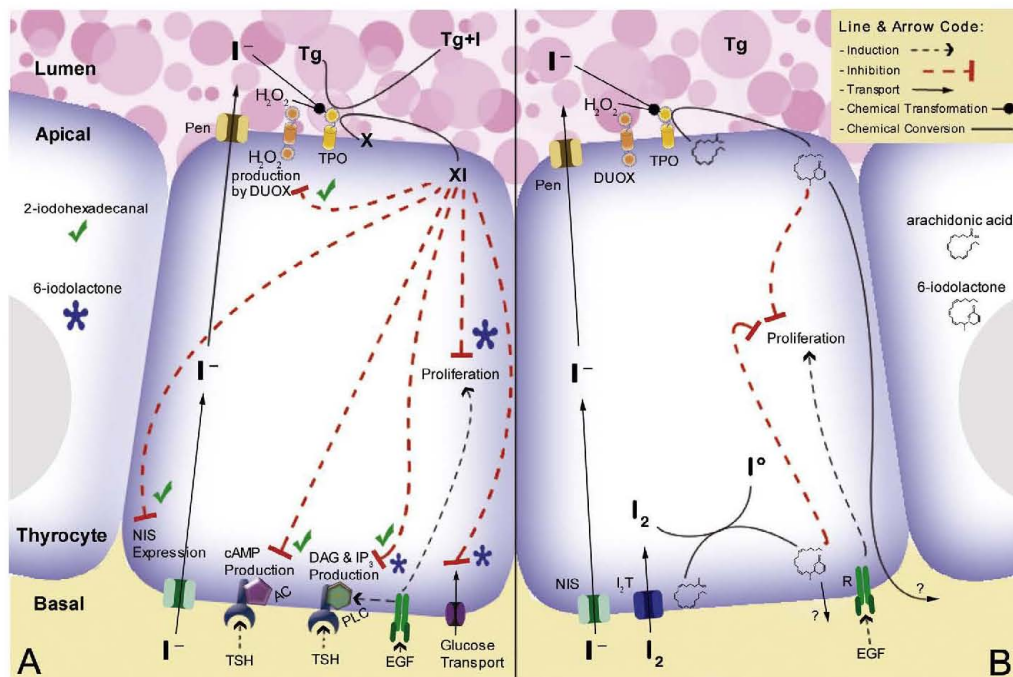


Fig. 2. Schematic representation of inhibitory effects of 2-IHDA and 6-IL on thyrocyte physiology (panel left, A) and generation of 6-IL (panel right, B). Tg: thyroglobulin; Tg+I: iodinated thyroglobulin; I⁻: iodide; H₂O₂: hydrogen peroxide; Pen: pendrin; DUOX: dual oxidase; TPO: thyroperoxidase; X: the lipid substrate converted into the active iodinated molecule XI; NIS: sodium iodide symporter; TSH: thyroid-stimulating hormone; cAMP: cyclic 3',5'-adenosine monophosphate; DAG: diacylglycerol; IP₃: inositol 1,4,5-triphosphate; AC: adenyl cyclase coupled to the stimulatory G protein subunit of TSH receptor; PLC: phospholipase C coupled to the stimulatory G protein subunit of TSH receptor; R: receptor; EGF: epidermal growth factor; I₂: molecular iodine; I₂T: unidentified molecular iodine transporter.

plasmalogens, and its presence has been described in horse [52] and dog thyroid [53]. Studies on thyroid autoregulation demonstrate that this lipid blocks intracellular pathways affected by iodide excess, like cAMP [54] and H₂O₂ [53] production and adenylyl cyclase activity [55]. It is possible that these distinct iodolipid classes (iodolactones and iodoaldehydes) could have alternative and/or complementary roles, depending on the physiological context or tissue type (Table 1) (Fig. 2A); however, this review will be focuses on the iodolactones derived from the iodination of AA.

4. Generation and subcellular location of iodolactones

Although *in vitro* chemical reactions generate similar quantities of 6-IL and 14-IL, after the addition of AA and potassium iodide to rat thyroid lobes in culture medium, only 6-IL can be identified [19]. Dugrillon et al. [21] were able to demonstrate 6-IL generation inside of *ex vivo* thyroid follicles of swine, and the participation of TPO was proven since the formation of this iodolipid was blocked with methimazole [19]. It must be emphasized that in these experiments the exogenous addition of AA was necessary for 6-IL formation. Other important observations were that inhibition of cyclooxygenases (COX) by indomethacin increased lipid iodination and, in contrast, blocking phospholipase A₂ (PLA₂) by mepacrine decreased the amount of radiolabeled iodolipids formed [66]. These findings lead us to the following observations about 6-IL formation: (1) one site of the AA molecule is iodinated preferentially *in vivo* (C6>C14); (2) there is a requirement for free AA with a carboxyl moiety available to react with iodine (reactive form I⁰ or I⁺) to generate the iodolactone; (3) the amount of free AA depends on the PLA₂ activity, since the majority of AA is esterified to phospholipids, and (4) the conversion of AA to eicosanoids by COX and lipoxygenases (LOX) decreases its availability as an iodination substrate. An important finding that supports the endogenous generation of iodolactones was made in a patient affected by Grave's disease, who was treated with high doses of iodide (15 mg/day) for 10 days prior to undergoing surgery. Thyroid tissue from this patient was subjected to a lipid extraction process, and the presence of 6-IL was confirmed by GC-MSMS [65]. Although only a low amount of 6-IL was generated, the exceptionally high potency exhibited by this iodolipid is known from studies of thyroid growth, in which a 40- to 50-fold lower concentration of 6-IL (1.0 μM) exerts antiproliferative effects similar to those of 40–50 μM iodide [21,65,67].

Regarding its site of synthesis, initial studies show that 6-IL is generated, with the participation of TPO, at the apical membrane in thyrocytes (Fig. 2B); however, radiolabeled iodolipids have also been found in the mitochondrial fraction after ¹²⁵I-Na administration [66]. Another potential region for formation and action of this iodocompound could be at the plasma membrane level; studies show that 6-IL supplement inhibited IP₃ generation induced by EGF, but not IP₃ or cAMP generation induced by TSH, suggesting that 6-IL actions are at the membrane level near phospholipase C [49]. Like 6-IL, other iodinated AA derivatives such as 14-IL or I-OH-AA could have effects at the membrane level, since glucose and amino acid transport coupled to Na-K-ATPase activity were partially inhibited by administration of any of these iodolipids [63] (Table 1).

5. 6-IL effectors

Paradoxically, the antiproliferative and apoptotic effects of 6-IL were not studied in the context of the thyroid, instead most of them have been described in mammary gland [68,69]. Breast cancer cells (MCF-7) are able to take up iodide (through NIS) [70] and independent of NIS, they can internalize molecular iodine (I₂) [71]. Using high performance liquid chromatography (HPLC), a compound with the same retention time as the 6-IL standard was recently detected

in tumoral mammary gland from a rat supplemented with I₂ [72], as well as in ¹²⁵I₂-treated MCF-7 cells [71], indicating that this compound can be generated in neoplastic tissue as it is in thyroid tissue. In MCF-7 cells it has been shown that 6-IL serves as a ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs), particularly the gamma isotype (PPARγ) [69]. PPARs are ligand-dependent transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily. They are involved in lipid metabolism, energy homeostasis, and differentiation, and recently have been associated with positive or negative effects on carcinogenesis in various tissues [73,74]. PPARγ controls glucose metabolism and adipose differentiation, and it is also involved in cellular arrest and/or apoptotic induction [75–79]. In fact, agonists/antagonists of these receptors are being tested in clinical trials as antineoplastic options. The few results reported to date show contradictions, ranging from no effect to moderately useful responses for some cancers. Analysis of these opposing findings is still in progress and has been recently reviewed by Joshi et al. [80]. Consistent with the effects of PPARγ-ligands, the 6-IL/PPAR complex can bind to and activate the PPAR responsive element, as evidenced by electrophoretic mobility shift assays and luciferase transactivation assays, respectively [69]. With regard to cell arrest, 0.5 μM 6-IL treatment induces p53 expression with consequent p21 elevation [68]. It is well known that p21 participates in cell cycle arrest, inhibiting the G1-phase progression induced by p53 [81]. Consistent with this p53–p21 expression, when either cancer (MCF-7) or normal (MCF-12) breast cells are treated with 0.1–0.5 μM 6-IL, approximately 70% of them remain in G1-phase [68]. When a moderate concentration of 6-IL (0.5 μM) is administered, both caspase-dependent and independent apoptotic effects (increases in Bax-caspase and AIF/PPAR-1, respectively) have been described in MCF-7 cells [68]. Moreover, moderate 6-IL supplementation (1 μM) in MCF-7 cells is accompanied by a repression of PPARα and stimulation of PPARγ expression [69]. PPARα has been associated with carcinogenesis promotion in mammary cancer [82,83]. It is possible that the 6-IL/PPARγ activation suppresses the pro-tumoral induction of PPARα by binding to the PPAR-responsive element present within the PPARα gene, thereby inhibiting its expression [69,84].

In addition, 6-IL may promote cell differentiation, an action that also involves PPARγ activation (Fig. 3). In this regard, it has been proposed that PPARγ activation is antiproliferative since it induces differentiation. Treatment with PPARγ agonists inhibits cancer cell growth by inducing G0–G1 cell-cycle detention, promoting differentiation, and reverting the epithelial–mesenchymal transition (EMT) [85]. At the molecular level, EMT is characterized by an intercellular disruption involving suppression of adhesion molecule expression (e.g., E-cadherin), induction of mesenchymal proteins such as N-cadherin or Vimentin, and acquisition of chemoresistance by up-regulation of ATP binding cassette (ABC) transporters and anti-apoptotic markers like Bcl2, Bcl-xl, or Survivin [86]. In functional studies it has been demonstrated that, similar to 5 μM rosiglitazone, a highly specific, synthetic PPARγ ligand, the same concentration of 6-IL is able to generate intracellular lipid accumulation in MCF-7 cells as well as decreases in Bcl2 [68,69]; lipid accumulation is considered a marker of terminal differentiation in human breast cancer cell lines [87].

6. Antitumor properties of 6-IL

Recently, the antitumor potential of 6-IL has been explored in diverse cancer cell lineages that show differential sensitivity: neuroblastoma, glioblastoma, melanoma, lung, pancreas (5 μM) [88], colon (10 μM) [89], and prostate (1–50 μM) [90]. These studies also provide evidence about the 6-IL mechanisms that involve intrinsic apoptotic pathways accompanied by the classic

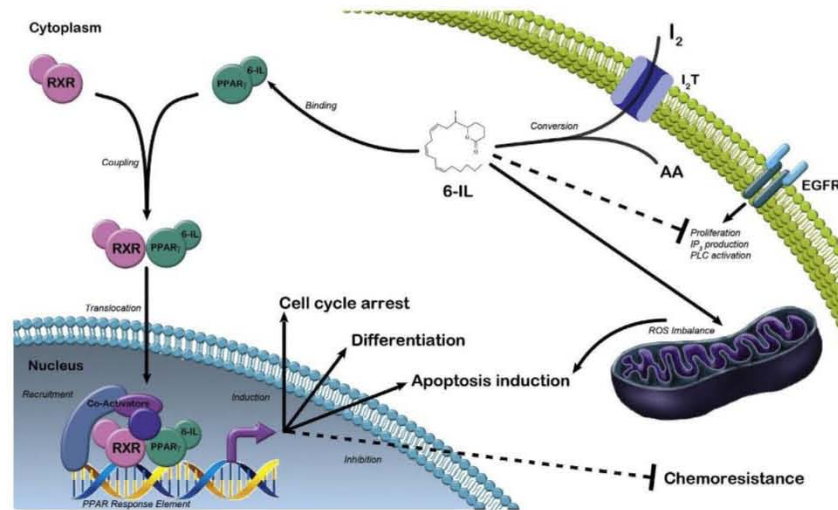


Fig. 3. Generation and intracellular actions of 6-IL in extrathyroid cells. Molecular iodine supplement is incorporated into the membrane cell by facilitated diffusion transport (I₂T) and binds with arachidonic acid (AA) molecules to generate 6-IL. This iodolipid could act at two levels: direct reaching mitochondria membrane and activating apoptotic mechanism as result of ROS imbalance; and/or indirect action, by 6-IL ligand with PPARγ/RXR receptors triggering cell cycle arrest, differentiation and apoptotic induction, and restrain the installation of chemoresistance. PPARγ: peroxisome proliferator-activated receptor, gamma isotype; RXR: retinoid X receptor; EGFR: epidermal growth factor receptor; IP₃: inositol 1,4,5-triphosphate; PLC: phospholipase C; ROS: reactive oxygen species.

morphological changes of apoptosis (pyknosis, karyorrhexis, cell shrinkage, and membrane blebbing) and decreased PCNA expression [89]. In addition to the well-documented effects induced by 6-IL that include apoptosis [68,90], cell cycle arrest [68], differentiation [69], and anti-invasiveness [89], another reactive oxygen species (ROS)-mediated pathway has also been proposed. Evidence of increased ROS production and lipoperoxidation levels after 10 μM 6-IL treatment [89], as well as inhibition of 6-IL-induced mitochondrial membrane disruption by N-acetyl-cysteine supports this idea [88]. The wide diversity in sensitivity, functional effects, and mechanistic actions reported for this iodolipid suggest that the effects of 6-IL depend on the cellular or tissue context, and further studies should be designed to analyze the physiological role of this iodolipid in both normal and pathological conditions.

7. Toward clinical application

There are few studies about 6-IL transport and stability *in vivo*. Reports of Pisarev's group show that intraperitoneal or oral administration of 6-IL, 5–10 μg over a period of 10 days exerts a significant antitumor action without detrimental effects on thyroidal or general metabolism (no change in urea, acetylcholinesterase activity, cholesterol, total protein, and total T3 and T4) [58,61,62]. Similarly, the *i.p.* injection of 6-IL (15 μg/day for 30 days) reduces the growth of HT-29 cell xenografts on NIH nude mice [89]; however, the pharmacodynamic distribution, diffusion mechanisms, and/or the tissues that preferentially take up 6-IL have not been determined. In contrast, iodine circulation and its tissue-specific uptake have been well studied at concentrations including antitumoral doses, and no harmful effects on thyroidal or general physiology were observed [91–95]. Moreover, long-term (3–8 months) 5 mg/day I₂ supplements, a dose similar to the intake of the eastern populations of Japan [1,96], have been shown to be

safe for treatment of human mammary fibrocystic disease [97,98], breast cancer,¹ or prostate hyperplasia.² Thus, the preferentially local formation of 6-IL in proliferating [65] or neoplastic tissues [72] from organs capable of iodine uptake, together with its lack of damage to normal tissues allows I₂ supplement to be considered a good example of the "magic bullet" concept. Paul Ehrlich inspired this term over one hundred years ago for the arsenic derivatives used against syphilis [99,100]; since then this notion has inspired generations of scientists to devise powerful and selective molecular cancer chemotherapeutics. The prime requirements for a 'magic bullet' are that it has high selectivity for a therapeutic target and it is innocuous toward the patient's normal cells [99,100]. In search of these 'magic bullets' a broad range of chemotherapeutics has been explored, including antibodies, liposomes, immunoliposomes, and nanomaterials [101–103], but in all instances, overcoming the side effects is a hard experimental and clinical obstacle. Thus, the ability of certain organs to take up iodine together with high arachidonic acid concentration in pathological tissues like mammary [104–108] and prostate cancers [109,110] makes molecular iodine a magic bullet that acts through the formation of specific effector compounds like 6-IL.

¹ Peralta G, Torres J, Delgado G, Domínguez A, De Obaldia R, Duarte L, et al. Iodine exhibits dual effects on breast cancer as a co-treatment with anthracyclines: anti-neoplastic synergy and cardioprotector. 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orlando, Florida, April 2–6, 2011; American Association for Cancer Research: Philadelphia, PA, 2011 [Poster Number 3509/16].

² Anguiano B, Ledezma O, Juárez M, Nuñez F, Aceves C. Therapeutic effect of iodine on benign human prostatic hyperplasia. 14th International Thyroid Congress, Paris, France, September 11–16, 2010; European Thyroid Association, American Thyroid Association, Asia & Oceania Thyroid Association, Latin American Thyroid Society, 2010 [Poster Number P-0051].

Authors' contributions

MNV performed the literature search and wrote the manuscript, CA made substantial contributions to the conception and design of the review. Both authors have read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that no competing financial interests exist.

Acknowledgments

This work was partially supported by grants: PAPIIT-UNAM IN200813 and CONACYT 176911. Mario Nava-Villalba was a Doctoral student in the UNAM Biomedical Science Program and received a fellowship from CONACYT (No. 215708). The authors are grateful to Leonor Casanova for academic support, Dorothy Pless for proofreading, Francisco Javier Valles for bibliographic assistance and Fernando López-Barrera for assistance with the graphics.

References

- Aceves C, Anguiano B, Delgado G. The extrathyronine actions of iodine as antioxidant, apoptotic, and differentiation factor in various tissues. *Thyroid* 2013;23(8):938–46.
- Anguiano B, Aceves C. Iodine in mammary and prostate pathologies. *Curr Chem Biol* 2011;5(3):177–82.
- Shrivastava A, Tiwari M, Sinha RA, et al. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *J Biol Chem* 2006;281(28):19762–71.
- Alfaro-Hernández Y, Aceves C. The other face of iodine: a protective free radical? In: Díaz-Muñoz M, Santamaria A, editors. Pro-oxidant reactions: physiological and pathological implications. Kerala, India: Research Signpost; 2009. p. 241–53.
- Cabral GA. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Sci* 2005;77(14):1699–710.
- Konaklieva MI, Plotkin BJ. Lactones: generic inhibitors of enzymes? *Mini Rev Med Chem* 2005;5(1):73–95.
- Michalik L, Auwex J, Berger JP, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58(4):726–41.
- Sladek FM. What are nuclear receptor ligands? *Mol Cell Endocrinol* 2011;334(1–2):3–13.
- Wang Z. Iodolactonization. In: Wang Z, editor. *Comprehensive organic name reactions and reagents*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009. p. 1521–5.
- Bougault MJ. Action de l'iode et l'oxyde jaune de mercure sur les acides à fonction éthylénique. Séparation des isomères. *C R Acad Sci* 1904;139(21):864–71.
- Bougault MJ. Action de l'acide hypoiodeux naissant sur les acides non saturés. *Ann Chim Phys* 1908;15:296–312.
- Bougault MJ. Action de l'acide hypoiodeux naissant sur les acides non saturés. Lactones iodées. *Ann Chim Phys* 1908;14:145–83.
- Corey EJ, Weinschenker NM, Schaaf TK, et al. Stereo-controlled synthesis of prostaglandins F-2a and E2 (dl). *J Am Chem Soc* 1969;91(20):5675–7.
- Danishbefsky S, Schuda PF, Kitahara T, et al. The total synthesis of dl-vermolepin and dl-vermolemin. *J Am Chem Soc* 1977;99(18):6066–75.
- Zhou Q, Snider BB. Synthesis of (+/-)-vibrallactone. *Org Lett* 2008;10(7):1401–4.
- Turk J, Henderson WR, Klebanoff SJ, et al. Iodination of arachidonic acid mediated by eosinophil peroxidase, myeloperoxidase and lactoperoxidase. Identification and comparison of products. *Biochim Biophys Acta* 1983;751(2):189–200.
- Pisarev MA, Gärtner R. Autoregulatory actions of iodine. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *The thyroid. A fundamental and clinical text*. Los Angeles: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 85–90.
- Gärtner R. Autoregulation of thyroid growth and function by iodine: independent regulation of the thyroid gland by iodocompounds. In: Preedy VR, Burrow GN, Watson RR, editors. *Comprehensive handbook of iodine. Nutritional, biochemical, pathological and therapeutic aspects*. San Diego: Academic Press, Elsevier; 2009. p. 243–8.
- Boeynaems JM, Hubbard W. Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by the rat thyroid. *J Biol Chem* 1980;255(19):9001–4.
- Panneels V, Juvenal G, Boeynaems J, et al. Iodide effects on the thyroid: biochemical, physiological, pharmacological, and clinical effects of iodine in the thyroid. In: Preedy VR, Burrow GN, Watson RR, editors. *Comprehensive handbook of iodine. Nutritional, biochemical, pathological and therapeutic aspects*. San Diego: Academic Press, Elsevier; 2009. p. 303–14.
- Dugrillon A, Bechtner G, Uedelhoven WM, et al. Evidence that an iodolactone mediates the inhibitory effect of iodide on thyroid cell proliferation but not on adenosine 3',5'-monophosphate formation. *Endocrinology* 1990;127(1):337–43.
- Henderson W, Hubbard WC, Klebanoff SJ, et al. Iodination of arachidonic acid by the iron/H₂O₂/iodide system. *Lipids* 1983;18(5):390–2.
- Monteagudo ES, Caro HN, Veleiro AS, et al. Synthesis and characterization of iodinated derivatives of arachidonic acid. *An Soc Quim Argent* 1990;78(1):31–6.
- Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem* 1948;174(2):555–64.
- Ris-Stalpers C. Physiology and pathophysiology of the DUOXes. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(9–10):1563–72.
- Eng PH, Cardona GR, Fang SL, et al. Escape from the acute Wolff–Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 1999;140(8):3404–10.
- Wartofsky L, Ransil BJ, Ingbar SH. Inhibition by iodine of the release of thyroxine from the thyroid glands of patients with thyrotoxicosis. *J Clin Invest* 1970;45(1):78–86.
- Rognoni JB, Penel C, Ducret F. Vascularization and iodide transport down regulation in rat goitre. *Eur J Endocrinol* 1984;105(1):40–8.
- Arntzenius AB, Smit UJ, Schipper J, et al. Inverse relation between iodine intake and thyroid blood flow: color Doppler flow imaging in euthyroid humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73(5):1051–5.
- Pisarev MA, Itoiz ME. Action of KI on stimulated thyroid protein biosynthesis. *Endocrinology* 1972;90(5):1409–12.
- Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, et al. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology* 2000;141(2):598–605.
- Burkhanov RB, Matsuzaki S. Excess iodine induces apoptosis in the thyroid of goitrogen-pretreated rats in vivo. *Thyroid* 2000;10(2):123–9.
- Van Sande J, Dumont JE. Effects of thyrotropin, prostaglandin E1 and iodide on cyclic 3',5'-AMP concentration in dog thyroid slices. *Biochim Biophys Acta* 1973;313(2):320–8.
- Pochet R, Van Sande J, Erneux C, et al. Inhibition of thyroid adenylate cyclase by iodide. *FEBS Lett* 1977;83(1):33–6.
- Van Sande J, Grenier G, Willems C, et al. Inhibition by iodide of the activation of the thyroid cyclic 3',5'-AMP system. *Endocrinology* 1975;96(3):781–6.
- Boeynaems JM, Van Sande J, Dumont JE. Which iodolipids are involved in thyroid autoregulation: iodolactones or iodoaldehydes? *Eur J Endocrinol* 1995;132:733–4.
- Dugrillon A. Iodolactones and iodoaldehydes—mediators of iodine in thyroid autoregulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996;104(Suppl 4):41–5.
- Taurog A, Tong W, Chaikoff IL. An unidentified iodine compound formed by incubation of cell-free preparations of tissue with iodide-[¹³¹I]. *J Biol Chem* 1957;227(2):759–72.
- DeGroot LJ, Carvalho E. Iodide binding in thyroid cellular fractions. *J Biol Chem* 1960;235(5):1390–7.
- Vilkki P. An iodide-complexing phospholipid. *Arch Biochem Biophys* 1962;97:425–7.
- Mauchamp J, Nunez J, Roche J. On the iodinated lipids of the thyroid gland and their possible participation in hormogenesis. *C R Seances Soc Biol Fil* 1963;157(3):971–3.
- Rodesch F, Dumont JE. Metabolic properties of isolated sheep thyroid cells. *Exp Cell Res* 1967;47(1–2):386–96.
- Shah DH, Shownken RC, Thakare UR. Iodinated thyrolypids. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1972;70(4):683–96.
- Rousset B, Poncet C, Dumont JE, et al. Intracellular and extracellular sites of iodination in dispersed hog thyroid cells. *Biochem J* 1980;192(3):801–12.
- Schneider P, Wolff J. Thyroidal iodide transport VI. On a possible role for iodide-binding phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1965;94(1):114–23.
- Posner I, Ordoñez L. Lipid-iodine association in the rat thyroid gland. *Biochim Biophys Acta* 1969;187(4):588–90.
- Shah DH, Thakare UR, Shownken RC, et al. Iodinated thyrolypids: their possible role in hormonogenesis. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1973;74(3):461–74.
- Boeynaems JM, Reagan D, Hubbard WC. Lactoperoxidase-catalyzed iodination of arachidonic acid: formation of macrolides. *Lipids* 1981;16(4):246–9.
- Dugrillon A, Gärtner R. delta-Iodolactones decrease epidermal growth factor-induced proliferation and inositol-1,4,5-trisphosphate generation in porcine thyroid follicles—a possible mechanism of growth inhibition by iodide. *Eur J Endocrinol* 1995;132(6):735–43.
- Langer R, Buzler C, Bechtner G, et al. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003;111(6):325–9.
- Gärtner R, Rank P, Ander B. The role of iodine and delta-iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells. *Hormones (Athens)* 2010;9(1):60–6.
- Pereira A, Braekman JC, Dumont JE, et al. Identification of a major iodolipid from the horse thyroid gland as 2-iodohexadecanal. *J Biol Chem* 1990;265(28):17018–25.
- Panneels V, Van den Bergen H, Jacoby C, et al. Inhibition of H₂O₂ production by iodoaldehydes in cultured dog thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 1994;102(1–2):167–76.
- Thomas L, Oglio R, Rivandeira DT, et al. Inhibition of goiter growth and of cyclic AMP formation in rat thyroid by 2-iodohexadecanal. *Mol Cell Endocrinol* 2010;317(1–2):141–7.

- [55] Panneels V, Van Sande J, Van den Bergen H, et al. Inhibition of human thyroid adenyllyl cyclase by 2-iodoaldehydes. *Mol Cell Endocrinol* 1994;106(1–2):41–50.
- [56] Thomasz L, Oglio R, Dagrosa MA, et al. 6 Iodo-8-lactone reproduces many but not all the effects of iodide. *Mol Cell Endocrinol* 2010;323(2):161–6.
- [57] Chazenbalk GD, Pisarev MA, Krawiec L, et al. *In vitro* inhibitory effects of an iodinated derivative of arachidonic acid on calf thyroid. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 1984;34(4):367–73.
- [58] Pisarev MA, Chazenbalk GD, Valsecchi RM, et al. Thyroid autoregulation. Inhibition of goiter growth and of cyclic AMP formation in rat thyroid by iodinated derivatives of arachidonic acid. *J Endocrinol Invest* 1988;11(9):669–74.
- [59] Ohayon R, Boeynaems JM, Braekman JC, et al. Inhibition of thyroid NADPH-oxidase by 2-iodohexadecanal in a cell-free system. *Mol Cell Endocrinol* 1994;99(1):133–41.
- [60] Chazenbalk GD, Valsecchi RM, Krawiec L, et al. Thyroid autoregulation. Inhibitory effects of iodinated derivatives of arachidonic acid on iodine metabolism. *Prostaglandins* 1988;36(2):163–72.
- [61] Pisarev MA, Krawiec L, Juvenal GJ, et al. Further studies on the anti-goitrogenic action of iodoarachidonates. *Thyroidology* 1992;4(1):27–9.
- [62] Pisarev MA, Krawiec L, Juvenal GJ, et al. Studies on the goiter-inhibiting action of iodolactones. *Eur J Pharmacol* 1994;258(1–2):33–7.
- [63] Krawiec L, Chester HA, Bocanera IV, et al. Thyroid autoregulation: evidence for an action of iodoarachidonates and iodide at the cell membrane level. *Horm Metab Res* 1991;23(7):321–5.
- [64] Pisarev MA, Bocanera IV, Chester HA, et al. Effect of iodoarachidonates on thyroid FRTL-5 cells growth. *Horm Metab Res* 1992;24(12):558–61.
- [65] Dugrillon A, Uedelhoven WM, Pisarev MA, et al. Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Horm Metab Res* 1994;26(10):465–9.
- [66] Chazenbalk GD, Pisarev MA, Juvenal GJ, et al. Biosynthesis and regulation of iodolipids in calf thyroid. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985;108(1):72–8.
- [67] Gärtner R, Dugrillon A, Bechtner G. Evidence that iodolactones are the mediators of growth inhibition by iodine on the thyroid. *Acta Med Austriaca* 1996;23(1–2):47–51.
- [68] Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, et al. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(4):1003–11.
- [69] Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, et al. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;89(1–2):34–42.
- [70] Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, et al. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(15):8519–24.
- [71] Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, et al. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(4):1147–58.
- [72] Aceves C, García-Solís P, Arroyo-Helguera O, et al. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Mol Cancer* 2009;8(1):33.
- [73] Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer* 2004;4(1):61–70.
- [74] Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, et al. The role of PPARs in cancer. *PPAR Res* 2008;2008:102737.
- [75] Nuñez-Anita RE, Cajero-Juárez M, Aceves C. Peroxisome proliferator-activated receptors: role of isoform gamma in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11(7):775–86.
- [76] Yin F, Wakino S, Liu Z, et al. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286(5):916–22.
- [77] Yin Y, Russell RG, Dettin LE, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 2005;65(9):3950–7.
- [78] Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-ol acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63(18):5926–39.
- [79] Elstner E, Müller C, Koshizuka K, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(15):8806–11.
- [80] Joshi H, Tanushree P, Ramaa CS. A new dawn for the use of thiazolidinediones in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2014;23(4):501–10.
- [81] Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13(12):1501–12.
- [82] Roberts-Thomson SJ, Snyderwine EG. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in normal rat mammary gland and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary gland tumors from rats fed high and low fat diets. *Toxicol Lett* 2000;118(1–2):79–86.
- [83] Suchanek KM, May FJ, Robinson JA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog* 2002;34(4):165–71.
- [84] Pineda Torra I, Jamshidi Y, Flavell DM, et al. Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element. *Mol Endocrinol* 2002;16(5):1013–28.
- [85] Reka AK, Kurapati H, Narala VR, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer Ther* 2010;9(12):3221–32.
- [86] İleri OD, Kars MD, Arpacı F, et al. Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomed Pharmacother* 2011;65(1):40–5.
- [87] Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1998;1(3):465–70.
- [88] Rösner H, Torreman P, Möller W, et al. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines: No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;118(7):410–9.
- [89] Thomasz L, Oglio R, Rossich L, et al. 6 Iodo-8-lactone: a derivative of arachidonic acid with antitumor effects in HT-29 colon cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013;88(4):273–80.
- [90] Aranda N, Sosa S, Delgado C, et al. Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in differentiated and undifferentiated human prostate cancer cell lines. *Prostate* 2013;73(1):31–41.
- [91] Thrall KD, Bull RJ. Differences in the distribution of iodine and iodide in the Sprague-Dawley rat. *Fundam Appl Toxicol* 1990;15(1):75–81.
- [92] Thrall KD, Bull RJ, Sauer RL. Distribution of iodine into blood components of the Sprague-Dawley rat differs with the chemical form administered. *J Toxicol Environ Health* 1992;37(3):443–9.
- [93] Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta* 1993;1154(1):65–82.
- [94] Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, et al. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(5):1746–51.
- [95] Anguiano B, García-Solís P, Delgado G, et al. Uptake and gene expression with antitumoral doses of iodine in thyroid and mammary gland: evidence that chronic administration has no harmful effects. *Thyroid* 2007;17(9):851–9.
- [96] Cann SA, Van Netten JP, van Netten C. Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control* 2000;11(2):121–7.
- [97] Kessler JH. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *Breast J* 2004;10(4):328–36.
- [98] Ghent WR, Eskin BA, Low DA, et al. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Can J Surg* 1993;36(5):453–60.
- [99] García-Sánchez JE, García E, Merino ML. 100 years of Dr. Ehrlich's magic bullet (1909–2009). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28(8):521–33.
- [100] Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 2008;8(6):473–80.
- [101] Dillman RO. Monoclonal antibodies in the treatment of malignancy: basic concepts and recent developments. *Cancer Invest* 2001;19(8):333–41.
- [102] Newsome BW, Ernstoff MS. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy: have the magic bullets arrived? *Br J Clin Pharmacol* 2008;66(1):6–19.
- [103] Moros M, Mitchell SG, Gráz V, et al. The fate of nanocarriers as nanomedicines *in vivo*: important considerations and biological barriers to overcome. *Curr Med Chem* 2013;20(22):2759–78.
- [104] Hilf R, Goldenberg H, Michel I, et al. Biochemical characteristics of mammary glands and mammary tumors of rats induced by 3-methylcholanthrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res* 1969;29(5):977–88.
- [105] Rillema JA, Mulder JA. Arachidonic acid distribution in lipids of mammary glands and DMBA-induced tumors of rats. *Prostaglandins Med* 1978;1(1):31–8.
- [106] Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, et al. Fatty acids synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302(4):898–903.
- [107] Rolland PH, Martin PM, Jacquemier J, et al. Prostaglandin in human breast cancer: evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 1980;64(5):1061–70.
- [108] Wicha MS, Liotta LA, Kidwell WR. Effects of free fatty acids on the growth of normal and neoplastic rat mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1979;39(2 Pt. 1):426–35.
- [109] Baron A, Migita T, Tang D, et al. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem* 2004;91(1):47–53.
- [110] Yang P, Cartwright CA, Li J, et al. Arachidonic acid metabolism in human prostate cancer. *Int J Oncol* 2012;41(4):1495–503.

RESEARCH

Open Access



Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone

Mario Nava-Villalba¹, Rosa E. Nuñez-Anita², Alexander Bontempo¹ and Carmen Aceves^{1*}

Abstract

Background: Molecular iodine (I_2) exhibits antiproliferative and apoptotic effects on *in vivo* and *in vitro* cancer models. These effects are thought to be mediated by an iodinated arachidonic acid derivative, 6-iodolactone (6IL), and one of the proposed mechanisms is that 6IL activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptors type gamma (PPARG). These receptors have been implicated in the inhibition of carcinogenic processes, in addition to their classical role in maintaining lipid and glucose homeostasis. The aim of this study was to determine whether PPARG participates in the 6IL antiproliferative and apoptotic effects on the mammary cancer cell line MCF-7.

Methods: The 6IL/PPARG complex was inhibited by the PPARG antagonist GW9662, in both an endogenous and overexpressed (adenoviral vector infection) context, and stable PPARG-knockdown MCF-7 cells (RNA interference, confirmed with hydrolysis probes and Western blot), were used to corroborate the PPARG participation. 6IL effects on proliferation (measured by Trypan Blue exclusion) and apoptosis (phosphatidylserine identification by flow cytometer) were evaluated in conditions of chemical inhibition (GW9662) and silencing (RNA interference). A wound-healing assay was conducted on wild-type and stable PPARG-knockdown MCF-7 cells to evaluate the antimigrational effect of 6IL. Caspase-8 activity was evaluated to determine if the extrinsic pathway is involved in the effects of 6IL and I_2 treatment.

Results: Antiproliferative and pro-apoptotic 6IL effects require the activation of PPARG. In addition, wound-healing assays show that 6IL is able to inhibit MCF-7 cell migration and that PPARG plays a role in this phenomenon. Finally, the data exclude the participation of the extrinsic apoptotic pathway in 6IL- and I_2 -induced apoptosis.

Conclusions: These results support the previously proposed mechanism, in which the I_2 effects are mediated by 6IL, and they provide further support for the use of I_2 as coadjuvant in breast cancer treatment.

Keywords: Iodine, Iodocompounds, PPARG, Arachidonic acid, Mammary cancer, MCF-7, Iodolactone

Background

6-Iodo-5-hydroxy-8,11,14-eicosatrienoic acid, δ -lactone (6-iodolactone or 6IL) is an iodinated arachidonic acid (AA) derivative and has been proposed to mediate the antitumoral effects of iodine [1–3]. Molecular iodine (I_2), but not iodide (I^-), exerts antineoplastic actions on diverse tissues (mammary, prostate and thyroid glands, and on melanoma, pancreas carcinoma and neuroblastoma cell lines), and various studies suggest that these effects can

involve direct or indirect mechanisms [4–8]. In the direct effect, the oxidant/antioxidant property of I_2 can disrupt the mitochondrial membrane potential and trigger mitochondrion-mediated apoptosis [6, 9]; on the other hand, the indirect path involves the generation of iodolipid intermediates, and there is evidence that 6IL could be one such intermediate. The presence of 6IL has been reported in normal and tumoral mammary gland from rats with continuous I_2 supplements in their diet [2]. 6IL has also been observed in an *in vitro* model, in which an iodinated lipid co-migrating with the 6IL standard was detected in $^{125}I_2$ -treated MCF-7 cells [5].

* Correspondence: caracev@unam.mx

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México-Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro CP 76230, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



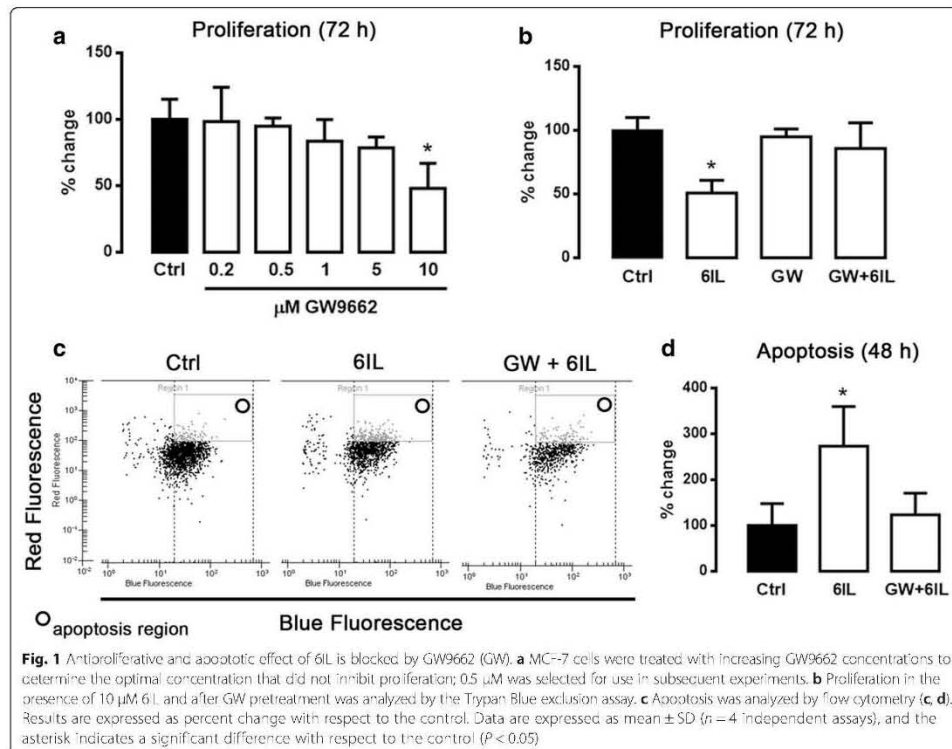
© 2015 Nava-Villalba et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

At the molecular level, both I₂ as 6IL generate antitumor effects through similar pathways. Both trigger a p53/p21-mediated cell growth arrest, and both induce Bax-caspases and AIF/PARP-1 apoptosis [1, 9]. In MCF-7 cells, 6IL supplement is accompanied by a significant stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor type gamma (*PPARG*) and inhibition of PPAR alpha (*PPARA*) expression [10]. Moreover, using electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), these authors demonstrated that 6IL is a PPAR ligand and can activate the PPAR response element (PPRE) (as shown by reporter gene transactivation assays). PPARs are involved in lipid metabolism, energy homeostasis and differentiation, and they have also been associated with positive or negative effects on carcinogenesis of various neoplasias [11–13]. While *PPARA* has been linked to carcinogenesis promotion [14, 15], *PPARG* or *NR1C3* [16, 17] is proposed to be an antineoplastic agent, since it inhibits proliferation, induces apoptosis and promotes differentiation [18–22]. These opposing effects of *PPARA* and *PPARG* have been documented in normal and tumoral breast tissue and mammary

cell lines [23, 24]. With respect to differentiation, 6IL induces cytoplasmic accumulation of lipid droplets, in a way comparable to that of the synthetic PPARG agonist rosiglitazone [10]. Thus, while previous work has shown a close relationship between PPARG and 6IL, here we use chemical and molecular approaches to demonstrate that the 6IL/PPARG complex is an intermediary in the antiproliferative and apoptotic effects of molecular iodine.

Results
GW9662 cancels the apoptotic and antiproliferative effects of 6IL

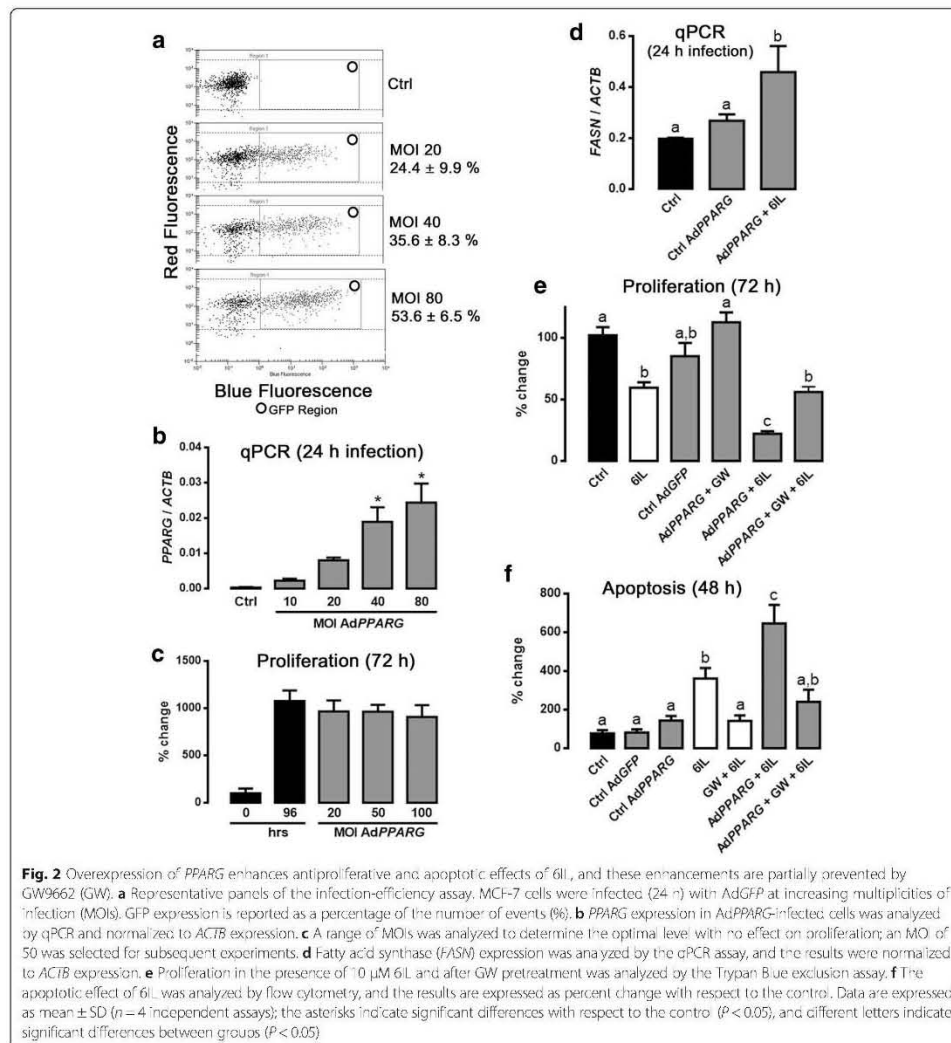
To demonstrate that PPARG activation plays a key role in the 6IL effects, we inhibited PPARG/6IL complex formation by blocking the PPARG ligand-binding domain with its highly specific antagonist GW9662. To determine the appropriate concentration of GW9662, i.e., a concentration that inhibited PPARG/6IL complex formation without causing the antiproliferative effects previously reported [25], we performed a dose–response curve (0.2 to 10 μM) for GW9662 in MCF-7 cells (Fig. 1a), and selected 0.5 μM



for further experiments. Figure 1b shows that the 6IL supplement exerted a significant antiproliferative effect, which was prevented when the cells were pre-incubated (2 h) with GW9662. The 6IL treatment induced a significant, nearly two-fold increase in the apoptotic population compared to the control level (Fig. 1c-d), and this effect was blocked when the cells were pretreated with GW9662.

Overexpression of PPARG enhances the antiproliferative and apoptotic effects of 6IL

Figure 2a and b show the infection efficiency of MCF-7 with the GFP- and PPARG-adenoviral vectors, as measured by GFP intensity and mRNA amplification, respectively. Figure 2c shows the proliferation rate with ascending MOI (details in methods section), and a MOI



of 50 was chosen for further experiments. Functional *PPARG* overexpression was confirmed by fatty acid synthase (*FASN*) expression, a *PPARG*-regulated gene (Fig. 2d). Figure 2e shows that the antiproliferative effect of the 6IL supplement was significantly intensified in the *AdPPARG*-infected group compared to the uninfected group, and that preincubation with GW9662 only partially prevented this pronounced effect. In contrast, the overexpression of *PPARG* increased the sensitivity of these cells to the apoptotic effect of 6IL, and this effect was strongly inhibited by GW9662 (Fig. 2f).

The silencing of *PPARG* expression blocks the antiproliferative and apoptotic effects of 6IL

To confirm the stable transfection of RNAi against *PPARG* mRNA in selected cells, GFP expression (from the *GFP* gene co-inserted with the RNAi into the HuSH™ plasmid) was assessed (Fig. 3a). *PPARG* silencing was confirmed by qPCR with specific Hydrolysis Probes (Fig. 3b and Table 1) and Western blot (Fig. 3c). Wild type (WT), Scramble-*PPARG* (Scramble) and RNAi-*PPARG* (RNAi) MCF-7 cells were treated with 10 μM 6IL over a 96-h period, and their proliferation rates were evaluated. Figure 3d shows that WT and Scramble-

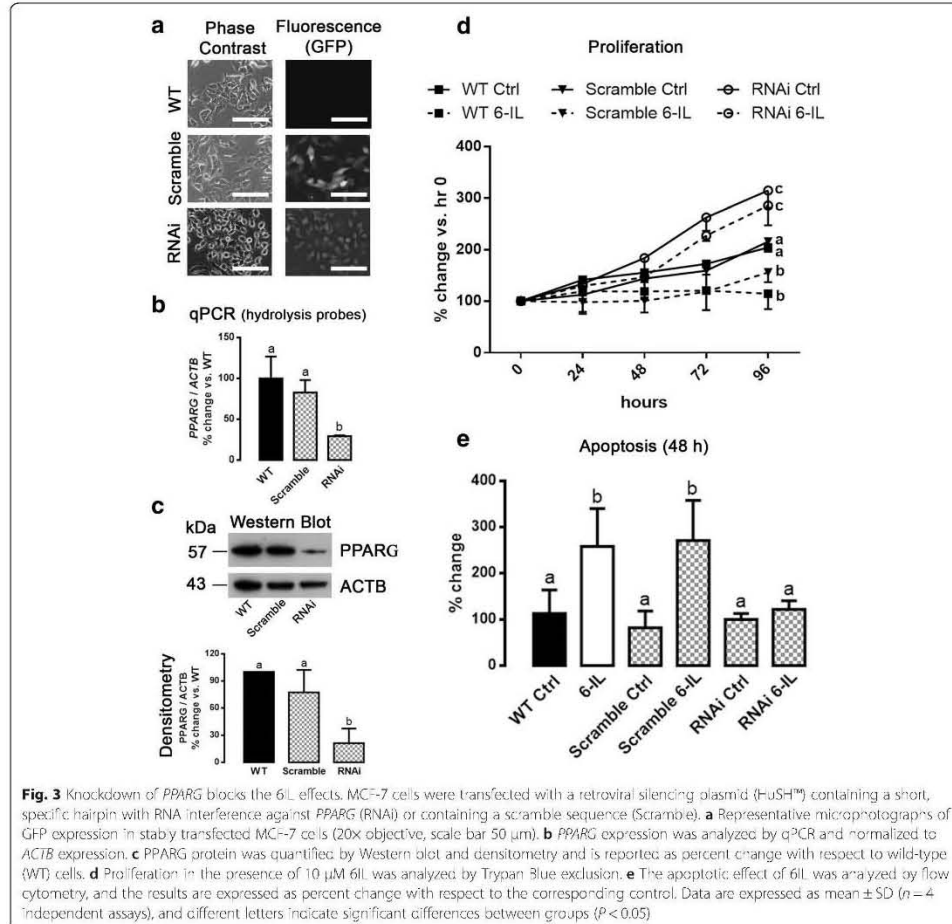


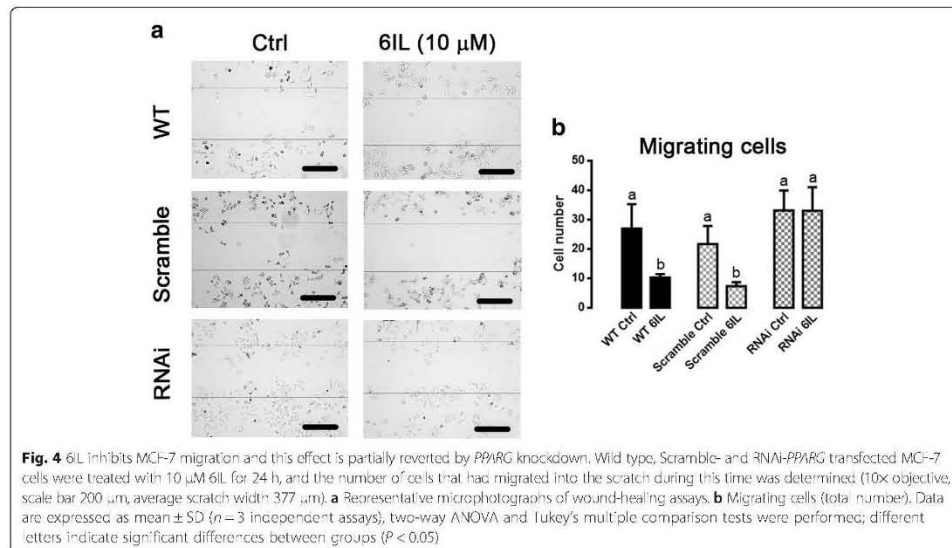
Table 1 Real time PCR primer sequences

Gene	Sequence (5'–3')	Annealing temp (°C)	ID	
<i>FASN</i>	Sense	GGAAATGGGAAGACACCTAATGGA	62	GenBank NM_004104.4
	Antisense	AGAGAGAGCTCAGATACGTTGAC		
<i>PPARG</i>	Sense	TCTCTCCGTAATGGAAGACC	62	GenBank L40904.2
	Antisense	GCATTATGAGACATCCCCAC		
<i>ACTB</i>	Sense	CCAATCATGAAGTGTGACGTTG	62	GenBank NM_001101.3
	Antisense	ACAGAGTACTTGGCCACAGGA		
<i>PPARG</i> Hydrolysis Probe	Sense	GATGTCTCATAATGCCATCAGGTT	60	RTPrimerDB ID: 5471
	Antisense	GGATTACGCTGGTCGATATCACT		
	Probe	CCAACAGCTTCTCTCTCGGCCTG		
<i>ACTB</i> Hydrolysis Probe	Sense	TCCITCCITGGGCAATGGAG	60	RTPrimerDB ID: 2418
	Antisense	AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT		
	Probe	CCIGTGGCAICCCAGAACATCC11C		

PPARG MCF-7 cells had the same proliferation rates, whereas RNAi-*PPARG* MCF-7 cells exhibited significantly faster proliferation. The 6IL supplement inhibited proliferation of WT and Scramble-*PPARG* MCF-7 cells, whereas it had no effect on the *PPARG*-knockdown group (RNAi-*PPARG*). Figure 3e summarizes the apoptotic effect of 6IL in these groups, showing significant apoptosis on WT and Scramble-*PPARG* cells and no effect on RNAi-*PPARG* MCF-7 cells.

6IL inhibits MCF-7 cell migration, but this effect is blocked by silencing *PPARG*

Groups were treated for 24 h with 10 μM 6IL or vehicle, and the migration rate was evaluated by a wound-healing assay (Fig. 4a). WT and Scramble-*PPARG* MCF-7 cells treated with 6IL showed significant inhibition of migration, around 60 %; however, 6IL did not change the migration rate of RNAi-*PPARG* MCF-7 cells (Fig. 4b).

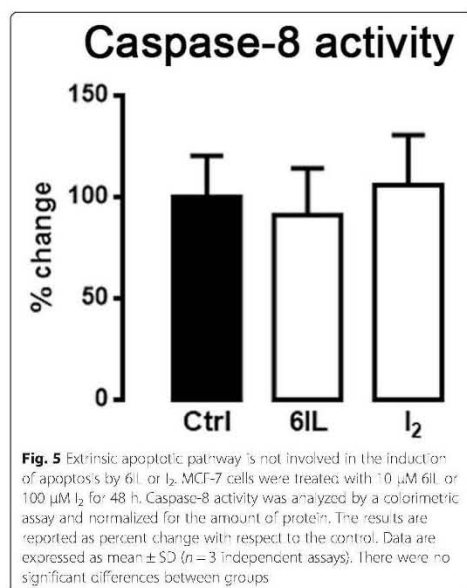


The 6IL induction of apoptosis is not activated by the extrinsic pathway

To evaluate the participation of the extrinsic pathway in the 6IL or I₂ effects on apoptosis, caspase-8 activity was evaluated. Neither 10 μM 6IL nor 200 μM I₂ treatments produced any change in caspase-8 activity (Fig. 5).

Discussion

A significant body of data from *in vivo* experiments [4, 26–29], clinical trials [30–33], and epidemiological reviews [34–36] support the notion that molecular iodine has a protective effect against the progression of neoplastic diseases and inflammatory/proliferative pathologies. An important fact to consider is that these beneficial effects occur only at relatively high iodine concentrations (milligrams/day) and only in those tissues that are able to capture iodine. In the case of mammary and prostate glands, both normal and tumoral cells internalize I₂ by a sodium/iodine symporter (NIS)-independent mechanism [1, 4, 5, 8, 37] that seems to involve a facilitated diffusion process (saturable and dependent on protein synthesis) [5]. It has not yet been determined how I₂ reacts with cell components, but I₂ is known to bind covalently to proteins and lipids [5]. The iodination of fatty acids generates several derivatives, but those from arachidonic acid (AA), like 6IL, are especially relevant since endogenous 6IL has been detected [38, 39], and it generates a range of biological effects [3].



The proposal that PPARG plays a role in the antitumor effects exhibited by I₂ after its conversion to 6IL is supported by the following evidence: 1) 6IL can be identified in both *in vitro* and *in vivo* models after administration of I₂ [1, 2]; 2) expression of *PPARG* is increased in I₂- or 6IL-supplemented conditions (possibly through an autoregulation mechanism) [2, 10]; 3) the antiproliferative effect of I₂ is only observed in cancer cells, which contain elevated concentrations of AA [2]; and 4) when incubated with total protein, 6IL can activate the PPAR response element (shown by luciferase transactivation assays) and is capable of inducing MCF-7 cells to accumulate lipid droplets in the same manner as the highly specific agonist rosiglitazone [10]. Previously, our group showed that the molecular antiproliferative/apoptotic actions of the 6IL/PPARG complex include the activation of p53 and the consequent increase of p21 expression, thereby inducing cell arrest and Bax-caspase expression, which activates the intrinsic apoptosis pathway [1, 28, 29]. GW9662 irreversibly modifies Cys²⁸⁵ in the PPARG ligand-binding domain with an IC₅₀ in the nanomolar range [40], as compared to the micromolar IC₅₀ of 6IL [1, 10]. This very high affinity can explain the almost complete inhibition by GW9662 observed in control cells. However, proliferation was not totally blocked in cells overexpressing *PPARG*. By its nature, the adenoviral system forces the cell to maintain unregulated expression; therefore, it is possible that the GW9662 concentration was not sufficient to saturate the PPARGs due either to their overexpression from the vector or to well-established, positive, autoregulatory mechanisms that maintain a high and continuous expression of *PPARG* [41, 42]. In contrast, the 6IL-induced effect on apoptosis is totally blocked by GW9662 in both control and *PPARG*-overexpressing cells. Thus, partial PPARG blockage may unmask this dual action of 6IL, in which only a few free PPARG receptors are required for the antiproliferative effect (maybe cell cycle arrest), but additional available receptors are needed to induce apoptosis. Similar dose-dependent responses of PPARG ligands have been described in the literature previously, showing induction of arrest at low concentrations, whereas at high levels they trigger apoptosis [43, 44]. Moreover and although molecular mechanisms for these preferential responses have not been explored, differential recruitment of coactivator cannot be excluded. More than 300 cofactors (coactivators, coregulators, corepressors, etc.) have been identified for the nuclear receptor family. It has been shown that these elements interact with one another and the same ligand modify transcription of many genes [45]. Interestingly, in the *PPARG*-overexpressing cells, 6IL administration also induces increased expression of *FASN*, a PPARG-regulated gene that is related to differentiation [46, 47]. This observation is consistent with the differentiation effect of 6IL, observed as lipid accumulation in MCF-7 cells [10].

In relation with silencing the expression of PPARG by molecular tools, our results show that the proliferation rate of RNAi-PPARG MCF-7 cells was two-fold greater than that of MCF-7 control cells, corroborating similar reports in other cancer cells [48]. The findings that MCF-7 cells with PPARG knockdown are insensitive to both the antiproliferative/apoptotic as well as to the anti-migratory effects of 6IL are clear indications that these receptors have an important role in the antineoplastic actions of I₂ or 6IL. The next step is to determine if 6IL affects the cell's invasive characteristics, since the activity of some metalloproteinases and other invasive markers has been blocked by PPARG ligands in several cancers [49, 50].

Finally, it has been described that I₂ or 6IL induces apoptosis effects through at least two pathways: AIF/ PARP1 and Bax-caspases [1, 9]; Bonfiglio *et al.* [51] reports that PPARG is able to activate the promoter of the *FasL* gene, thereby inducing extrinsic apoptosis in MCF-7 cells; this observation was reinforced recently by similar findings in human colorectal cancer cells [52]. In the present work we explored if the extrinsic apoptotic pathway is activated by the 6IL/PPARG complex. Our results show that caspase-8 activity is not increased by I₂ or by 6IL treatment; therefore, it seems that the apoptotic effects of I₂ and 6IL are mediated exclusively by intrinsic apoptosis pathways.

Conclusion

In summary, our data demonstrate that the antitumor effects of 6IL are mediated by PPARG; moreover, the induction of *FASN* expression strengthens previous observations that 6IL also exerts differentiating effects (adipogenic induction [10]). 6IL inhibits migration, an effect that may involve PPARG activation. Additionally, 6IL-induced apoptosis does not involve an extrinsic apoptotic pathway. Together, these data reinforce the notion that 6IL is a mediator of I₂ effects, and it strengthens the proposal that I₂ can be a useful adjuvant in treatment of cancer in tissues that take up iodine.

Methods

Materials and cell culture

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, puromycin and trypsin solution were supplied by GIBCO (Grand Island, NY, USA). Arachidonic acid (AA) (purity >99 %) was used to synthesize 6IL was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). GW9662 (purity >98 %), a specific PPARG antagonist, was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of the highest grade of purity commercially available. The breast cancer cell line MCF-7 was obtained from ATCC*. The cells were maintained in Basal Medium (DMEM

supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) at 37 °C and 5 % CO₂ prior to experiments.

Chemical synthesis of 6IL

6IL was synthesized with a modification of the method of Monteagudo [53]. Briefly, to a solution of AA (65 mg) in acetonitrile (0.8 mL) was added a solution of iodine (156 mg) in acetonitrile (8 mL) at 4 °C. The solution was kept under N₂, stirred for 4 h at room temperature and protected from light. The solution containing crude product was concentrated under low nitrogen flow to 0.5 ml and separated on preparative TLC using the solvent system CH₂Cl₂/MeOH (97.5:2.5). The reaction products, AA (rf: 0.5) and 6IL (rf: 0.88) standards were visualized by iodine vapors, and the 6IL synthesized was eluted with the same solvent and concentrated under low nitrogen flow.

Adenoviral infection

Recombinant adenoviruses expressing human PPARG (AdPPARG) were provided by Dr. Steals (Institut Pasteur de Lille, France). Adenovirus expressing GFP (AdGFP), provided by Dr. Hernandez-Gutiérrez (Universidad Panamericana, México), was used to confirm infection and as control. Viruses were multiplied in HEK-293 cells (provided by Dr. Martínez-Torres, Instituto de Neurobiología UNAM, México). Adenoviral titer was determined by the MOI (multiplicity of infection) test (AdEasy™ Vector System, application manual version 1.4). Prior to treatment with GW9662 and/or 6IL, MCF-7 cells were infected at an MOI of 50 for 24 h in basal medium.

Stable transfection with shRNA against PPARG

(RNAi-PPARG)

Retroviral silencing plasmid (HuSH™) containing a short, specific hairpin with RNA interference for PPARG, a puromycin resistance gene, a *tGFP* gene and a U6 promoter was obtained from Origen Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA) (RNAi-PPARG cells). A similar plasmid but with a scrambled sequence of the short RNAi hairpin against PPARG (Scramble-PPARG cells) was used as internal control. MCF-7 cells were transfected with 5 µg of plasmid and Xfect™ Transfection Reagent (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and they were maintained in culture for 48 h; after this time the transfected cells were selected with 1.0 µg/mL puromycin daily over 2 weeks and expanded. Transfection of the cells was confirmed by *tGFP* expression using an IX50 Olympus microscope with inverted reflected light fluorescence system (Olympus Inc., NY, USA), or by an Agilent 2100 bioanalyzer using an On-Chip flow cytometry

system (Agilent Technologies, USA). Knock-down of *PPARG* expression was evaluated by quantitative real time PCR (qPCR) with the specific Hydrolysis Probes (Sigma-Aldrich Co., MO) shown in Table 1 and by Western Blot. The selected and stably transfected population was maintained under "light pressure" (0.5 µg/mL puromycin) over the course of the experiments.

Experimental groups

The experiments were carried out on Ad*PPARG*-MCF-7-infected cells, on Scrambled- or RNAi-*PPARG*-MCF-7-transfected cells and on wild-type MCF-7 cells. The cells were cultured at a density of 5×10^5 cells in 60-mm culture dishes (Nalge Nunc International, Naperville, IL) for qPCR assays; 4×10^4 cells/well in 24-well culture plates for proliferation assays, 2×10^5 cells in 60-mm culture dishes for apoptosis experiments, 3×10^6 cells in 100-mm culture dishes for Western blot assays, 8×10^5 cells in 60-mm culture dishes for wound-healing assays, and 5×10^6 cells in 100-mm culture dishes for caspase-8 activity assays. All cells were seeded in complete basal medium and incubated for 24 h before treatment; at the beginning of experiments the medium was changed to low serum (0.5 %)-containing medium. The cells were treated for 24, 48, 72 or 96 h, (depending on the experiment) at 37 °C with 10 µM 6IL, 0.5 µM GW9662 or vehicle (ethanol) diluted before application in low serum-containing medium. In the GW9662/6IL-treated group, GW9662 was administered 2 h prior to 6IL treatment.

Quantitative PCR

Total RNA was extracted from cells using TRIzol® reagent (Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of total RNA was reverse transcribed using the Superscript II system (Invitrogen, Carlsbad, CA). qPCR was performed on the sequence detector system Roto-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) using SYBR green as a marker for DNA amplification. The reaction was performed with 1 µL cDNA template and the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, MA), using 40 cycles of three-step amplification (94 °C for 30 s, 55–62 °C for 30 s, 72 °C for 30 s) and the gene-specific primers listed in Table 1. PCR generated only the expected specific amplicon, which was demonstrated in each case by the melting temperature profile (dissociation curve) and by electrophoresis of 5 µL of the PCR product through a 2 % agarose gel in TAE buffer then visualization by ethidium bromide. No PCR products were observed in the absence of template. Gene expression was calculated using the D cycle threshold method and normalized to the content of *ACTB*, a non-regulated housekeeping gene. All measurements were performed in triplicate.

Western blot

Pellets of whole protein were obtained from lysed cells using RIPA buffer with complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH, Germany). The extracted proteins were quantified by the Bradford method (Bio-Rad protein assay; Hercules, CA) and analyzed by Western blot. SDS polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described [10], using stacking and resolving gels (the latter with 15 % acrylamide). Samples containing 50 µg of protein were applied to each lane. After electrophoresis, the proteins were electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Germany), which was then blocked overnight with TBS containing 5 % non-fat dry milk. The membranes were rinsed and treated with polyclonal anti-PPARG antibody (sc-7196, 57 kDa, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) and anti-ACTB (sc-1616, 43 kDa, 1:10,000, Santa Cruz Biotechnology Inc.) as a protein-loading control. Protein bands were visualized using a chemiluminescent detection system (ECL, Amersham Biosciences, UK). Densitometry was performed with Image Lab™ software (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), and chemiluminescence was normalized to the level of ACTB protein.

Proliferation assays

The effects on proliferation of 10 µM 6IL, 0.5 µM GW9662 and the GW9662/6IL mixture were analyzed using the Trypan Blue dye-exclusion assay. The cells (4×10^4 /well) were cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS on 24-well culture plates. Control cells were treated with 0.1 % ethanol (solvent for 6IL). After a 72-h treatment, the cells were harvested with trypsin-EDTA 0.05 % (Life Technologies Brand of Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Trypan Blue (0.4 %) was added; those cells that excluded the dye were counted with a hemocytometer under the microscope (Leica Inverted Microscope DMIL model, Germany); proliferation is reported as fold change with respect to control.

Apoptosis assays

Apoptosis was assessed by detecting phosphatidylserine on the external surface of the cell membrane with annexin V conjugated to the Cy5 fluorophore. To mark cells with intact cell membranes, Calcein-AM was used. Apoptosis was assessed by an Agilent Bioanalyzer 2100 and apoptosis kit following the manufacturer's instructions (Agilent Technologies, USA). Briefly, after treatment the cell density was adjusted to 1×10^6 per mL in 200 µL basal medium, and 200,000 cells were transferred to a 1.5-mL microtube and centrifuged at 2500 rpm for 3 min; the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 200 µL of 1X Binding Buffer (provided by the manufacturer), and 1 µL of Annexin V (Abcam®, UK) was added and incubated at room temperature for

10 min; after centrifugation at 2500 rpm for 3 min the supernatant was removed, and 1 μ L each of Calcein-AM and Fluorolink Cy5 in 200 μ L of Binding Buffer were added to the pellet and incubated for 10 min. Finally, the cells were collected by centrifugation and resuspended in Cell Buffer (provided by the manufacturer). A 10- μ L aliquot of cells from each treatment was placed on the cell fluorescence LabChip[®] together the solutions provided in the kit. The apoptotic cells are reported as a percentage of the number of events; this population is delimited in a standardized region by the program Cell-Chip Agilent 2100 Expert software (Agilent Technologies, USA).

Wound-healing assay

RNAi-PPARG MCF-7 cells, Scramble-PPARG MCF-7 cells and wild-type MCF-7 cells, 8×10^5 in each case, were seeded on 60-mm culture plates and incubated at 37 °C and 5 % CO₂. After 24 h, the attached cells were scratched three times in parallel with a 1000- μ L pipette tip (~377 μ m) and treated with 10 μ M 6IL or vehicle (ethanol) for 24 h. After this time, three new parallel wounds were performed as width control; the number of migrating cells was obtained by counting the number of cells inside this width control. The count was measured by Leica Application Suite Version 2.8.1., and the images were captured with a 10 \times objective lens using a Leica DM 2500 microscope and DFC 420 camera (Leica Microsystems, CMS GmbH, Germany). The results are presented as number of migrating cells of treated (6IL) vs. control (Ctrl) groups (mean \pm SD). At least three fields were analyzed for each plate, and each group was analyzed in three independent experiments.

Caspase-8 activity assay

The caspase-8/FLICE activity was measured using a commercial kit (ApoTarget, Invitrogen Co., CA, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, 5×10^6 MCF-7 cells were collected after a 48-h incubation with I₂ or 6IL. The cell pellet was lysed, and an aliquot containing 200 μ g of protein was incubated with DTT (10 mM) and a colorimetric substrate, IETD-*p*-nitroanilide; (*p*NA, final concentration 200 μ M) at 37 °C for 120 min in the dark. The samples were then read in the spectrophotometer at 405 nm. The absorbance of *p*NA from a treated sample was compared with an untreated control to determine the fold increase in caspase-8 activity.

Statistical analysis

One- or two-way ANOVA was performed to determine the significance of differences between groups, followed by Tukey's test for the significance of differences among multiple experimental groups. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), and values with $P < 0.05$

were considered statistically significant. In the figures, an asterisk indicates significant differences with respect to the control ($P < 0.05$), and different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MN-V performed the experiments, participated in scientific discussions and wrote the manuscript; REN-A performed Western blots, qPCR and proliferation assays and participated in scientific discussions; AB performed qPCR and wound-healing assays and contributed to scientific discussions; and CA provided the concept design and scientific direction, led scientific discussions and contributed to editing and drafting of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Felipe Ortíz, M. Juana Cárdenas-Luna and Antonio Prado-Galán for technical assistance; Martha Carranza and A. Edith Espino-Saldaña for technical advice and academic assistance; Leonor Casanova and Lourdes Lara for academic support; Alberto Lara, Omar Gonzalez, Ramon Martínez and Sandra Hernández for computer assistance and Dr. Dorothy Pless for proofreading. With special thanks to Guadalupe Delgado for technical and academic assistance; may she rest in peace.

Funding information

Mario Nava-Villalba was a graduate student of UNAM in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM and received fellowship 215708 from CONACYT. This work was partially supported by grants: PAPIIT-UNAM 200183 and CONACYT 76911.

Author details

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México-Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro CP 76230, Mexico. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico.

Received: 4 May 2015 Accepted: 24 August 2015

Published online: 17 September 2015

References

1. Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15:1003-11.
2. Aceves C, García-Solis P, Arroyo-Helguera O, Vega-Riveroll L, Delgado G, Anguiano B. Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Mol Cancer*. 2009;8:33.
3. Nava-Villalba M, Aceves C. 6-iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2014;112C:27-33.
4. García-Solis P, Alfaro Y, Anguiano B, Delgado G, Guzman RC, Nandi S, et al. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide (I⁻) treatment: evidence that I₂ prevents cancer promotion. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;236:49-57.
5. Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:1147-58.
6. Rösner H, Torremante P, Möller W, Gärtner R. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2010;118:410-9.
7. Gärtner R, Rank P, Ander B. The role of iodine and delta-iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells. *Horm (Athens)*. 2010;9:60-6.
8. Aranda N, Sosa S, Delgado G, Aceves C, Anguiano B. Uptake and antitumoral effects of iodine and 6-iodolactone in differentiated and undifferentiated human prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2013;73:31-41.

9. Shrivastava A, Tiwari M, Sinha RA, Kumar A, Balapure AK, Bajpai VK, et al. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *J Biol Chem*. 2006;281:19762–71.
10. Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009;89:34–42.
11. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:61–70.
12. Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, Doi T. The role of PPARs in cancer. *PPAR Res*. 2008;2008:102737.
13. Nunez-Anita RE, Cajero-Juarez M, Aceves C. Peroxisome proliferator-activated receptors: role of isoform gamma in the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11:775–86.
14. Roberts-Thomson SJ, Snyderwine EG. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in normal rat mammary gland and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary gland tumors from rats fed high and low fat diets. *Toxicol Lett*. 2000;118:79–86.
15. Suchanek KM, May FJ, Robinson JA, Lee WJ, Holman NA, Monteith GR, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog*. 2002;34:165–71.
16. Germain P, Staels B, Daquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58:685–704.
17. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58:726–41.
18. Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8806–11.
19. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*. 1998;1:465–70.
20. Yin F, Wakino S, Liu Z, Kim S, Hsueh WA, Collins AR, et al. Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286:916–22.
21. Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T, Gold D, McQueen T, Sutherland RL, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oiic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2003;63:5926–39.
22. Yin Y, Russell RG, Dettin LE, Bai R, Wei ZL, Kozikowski AP, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res*. 2005;65:3950–7.
23. Papi A, Guarnieri T, Storci G, Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, et al. Nuclear receptors agonists exert opposing effects on the inflammation dependent survival of breast cancer stem cells. *Cell Death Differ*. 2012;19:1208–19.
24. Papi A, Storci G, Guarnieri T, De Carolis S, Bertoni S, Avenia N, et al. Peroxisome proliferator activated receptor- α /hypoxia inducible factor-1 α interplay sustains carbonic anhydrase IX and apolipoprotein E expression in breast cancer stem cells. *PLoS One*. 2013;8:e54968.
25. Seargent JM, Yates EA, Gill JH. GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol*. 2004;143:933–7.
26. Eskin BA, Grotkowski CE, Connolly CP, Ghent WR. Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands. *Biol Trace Elem Res*. 1995;49:9–19.
27. Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tobinaga J, Wada M, Morita T, et al. Suppressive effect of iodine on DMBA-induced breast tumor growth in the rat. *J Surg Oncol*. 1996;61:5.
28. Soriano O, Delgado G, Anguiano B, Petrosyan P, Molina-Servin ED, Geasebatt ME, et al. Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz[*a*]anthracene-induced mammary tumors: association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18:529–39.
29. Alfaro Y, Delgado G, Cárabez A, Anguiano B, Aceves C. Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Mol Cancer*. 2013;12:45.
30. Ghent WR, Eskin BA, Low DA, Hill LP. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Can J Surg*. 1993;36:453–60.
31. Kessler JH. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *Breast J*. 2004;10:328–36.
32. Anguiano B, Ledezma O, Juarez M, Nuñez F, Aceves C. Therapeutic effect of iodine on benign human prostatic hyperplasia. In: 14th International Thyroid Congress. Paris, France: American Thyroid Association; 2010. p. 0051.
33. Peralta G, Torres J, Delgado G, Domínguez A, De Obaldia R, Duarte L, et al. Iodine exhibits dual effects on breast cancer as a co-treatment with anthracyclines: anti-neoplastic synergy and cardioprotector. In: 102nd Annual Meeting, AACR. Orlando, Florida: AACR; 2011. p. 3509/16.
34. Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Hypothesis: iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes Control*. 2000;11:121–7.
35. Venturi S, Donati FM, Venturi A, Venturi M, Grossi L, Guidi A. Role of iodine in evolution and carcinogenesis of thyroid, breast and stomach. *Adv Clin Path*. 2000;4:11–7.
36. Venturi S. Is there a role for iodine in breast diseases? *Breast*. 2001;10:79–82.
37. Olvera-Caltzontzin P, Delgado G, Aceves C, Anguiano B. Iodine uptake and prostate cancer in the TRAMP mouse model. *Mol Med*. 2013;19:409–16.
38. Dugrillon A, Bechtner G, Uedelhoven WM, Weber PC, Gärtner R. Evidence that an iodolactone mediates the inhibitory effect of iodide on thyroic cell proliferation but not on adenosine 3',5'-monophosphate formation. *Endocrinology*. 1990;127:337–43.
39. Dugrillon A, Uedelhoven WM, Pisarev MA, Bechtner G, Gärtner R. Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Horm Metab Res*. 1994;26:465–9.
40. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Conslor TG, et al. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 2002;41:6640–50.
41. Hondares E, Mora O, Yubero P, Rodríguez de la Concepción M, Iglesias R, Gilalt M, et al. Thiazolidinediones and retinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology*. 2006;147:2829–38.
42. Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. *Mol Cell Biol*. 2009;29:3544–55.
43. Koirala K, Wan Y, Liu Y, Wang X, Cui W, Wang C, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone on colon cancer cell growth. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2006;38(4):385–8.
44. Fujii D, Yoshida K, Tanabe K, Hihara J, Toge T. The ligands of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma inhibit growth of human esophageal carcinoma cells through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Anticancer Res*. 2004;24:1409–16.
45. Viswakarma N, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Borensztajn J, Xu J, et al. Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res*. 2010; doi:10.1155/2010/250126.
46. Kadegowda AKG, Bionaz M, Piperova LS, Erdman RA, Looor JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *J Dairy Sci*. 2009;92:4276–89.
47. Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo. *Diabetes Care*. 2004;27:1660–7.
48. Garcia-Bates TM, Peslak SA, Baglolle CJ, Magginiwar SB, Bernstein SH, Phipps RP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression and knockdown: impact on human B cell lymphoma proliferation and survival. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:1071–83.
49. Qin L, Gong C, Chen AM, Guo FJ, Xu F, Ren Y, et al. Peroxisome proliferator activated receptor γ agonist rosiglitazone inhibits migration and invasion of prostate cancer cells through inhibition of the CXCR4/CXCL12 axis. *Mol Med Rep*. 2014;10:695–700.
50. Rela AK, Kurapati H, Narala VR, Bommer G, Chen J, Standiford TJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor

- metastasis by antagonizing Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:3221–32.
51. Bonofiglio D, Gabriele S, Aquila S, Qi H, Belmonte M, Catalano S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activates fas ligand gene promoter inducing apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113:423–34.
 52. Yao Y, Li L, Huang X, Gu X, Xu Z, Zhang Y, et al. SERPINA3K induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activating the Fas/FasL/caspase-8 signaling pathway. *FEBS J.* 2013;280:3244–55.
 53. Monteagudo ES, Caro HN, Veleiro AS, Pisarev MA, Burton G. Synthesis and characterization of iodinated derivatives of arachidonic acid. *An Asoc Quim Argent.* 1990;78:31–6.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANEXO III

Índice de Figuras

Figura 1. Desarrollo multi-etapas de la glándula mamaria	5
Figura 2. Efecto de la migración de poblaciones humanas sobre la incidencia de CaM	16
Figura 3. Formación de la 6-yodolactona y la 14-yodolactona	18
Figura 4. Mecanismo de transcripción génica de los PPARs	20
Figura 5. Fórmula para obtener el factor de retención de un compuesto (rf)	25
Figura 6. Esquemas comparativos entre el protocolo tradicional y modificaciones al protocolo	25
Figura 7. Confirmación del modelo de sobreexpresión de los PPAR γ	32
Figura 8. Características del vector pGFP-V-RS, OriGene	37
Figura 9. Confirmación del modelo de silenciamiento de los PPAR γ	40
Figura 10. Cuantificación de AA entre células normales y tumorales	44
Figura 11. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de productos obtenidos de la yodación del AA	46
Figura 12. Efecto de la 6-IL y la 14-IL sobre la viabilidad celular	48
Figura 13. Efecto de la 14-IL y la 6-IL sobre la inducción de apoptosis	49
Figura 14. Bloqueo del efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL mediado por los PPAR γ	50
Figura 15. Bloqueo del efecto apoptótico de la 14-IL	51
Figura 16. La sobreexpresión de los PPAR γ intensifica los efectos antiproliferativo y apoptótico de la 6-IL, pero éstos se previenen cuando se administra el GW9662	53
Figura 17. El silenciamiento de los PPAR γ bloquea los efectos de la 6-IL	55
Figura 18. La 6-IL inhibe la migración de células MCF-7, sin embargo, este fenómeno es revertido por el silenciamiento de los PPAR γ	56
Figura 19. La vía extrínseca de la apoptosis no está involucrada en la inducción de dicho fenómeno ni por la 6-IL, ni por el I ₂	57

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos sentido/antisentido y en su caso sondas, de los genes utilizados para evaluar la expresión de los PPAR γ , así como su sobreexpresión funcional	35
--	----