



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**EVALUACIÓN DEL EFECTO COMBINADO DEL YODO MOLECULAR Y DE LOS
ANTIANDRÓGENOS, EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

PROYECTO DE T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

I.B.Q. CARLOS FERNANDO MONTES DE OCA MAGALLÓN

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO
(INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ABIMAEEL GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
(INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ
(INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)

QUERÉTARO, DICIEMBRE 2018.



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 bajo la dirección de la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el laboratorio de Metabolismo Energético, Campus Juriquilla, Querétaro. El proyecto fue financiado por CONACYT (235961) y PAPIIT-UNAN (IN209717). Carlos Montes de Oca fue becario de CONACYT (774791) y recibió beca PAPIIT (IN209717) para conclusión de Tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. ANTECEDENTES	4
1.1. Morfología y función de la próstata	4
1.2. Efectos de los andrógenos en la próstata	4
1.2.1. Mecanismos de acción de los andrógenos	5
1.3. Cáncer de próstata	8
1.3.1. Tratamientos	8
1.3.2. Antiandrógenos	10
1.3.2.1. Bicalutamida	11
1.3.2.2. Enzalutamida	11
1.3.3. Efecto de los antiandrógenos en modelos de cáncer prostático	12
1.3.3.1. Estudios preclínicos	12
1.3.3.2. Estudios clínicos	12
1.4. Captura de yodo y efectos antineoplásicos	13
1.4.1. Mecanismo de acción del yodo molecular	14
1.5. PPAR γ y su señalización cruzada con AR	15
1.5.1. Convergencia de la señalización PPAR γ y AR	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Líneas celulares	18
5.2. Cultivo celular	18
5.3. Diseño experimental	18
5.4. Ensayo de viabilidad celular	19
5.5. Análisis de la expresión génica mediante PCR tiempo real	19
5.6. Análisis estadístico	22
6. RESULTADOS	23
6.1. Efecto de los antiandrógenos en la viabilidad de las células LNCaP	23
6.2. Perfil temporal del efecto de los tratamientos en la viabilidad de las células LNCaP	23
6.3. Efecto dosis-respuesta de la bicalutamida en la viabilidad de las células DU-145	24
6.4. Perfil temporal de los tratamientos en la viabilidad de las células DU-145	25

6.5.Efecto de los tratamientos en la señalización del AR y PPAR γ en células LNCaP	26
6.6.Expresión de mediadores del ciclo celular en células LNCaP	26
7. DISCUSIÓN	29
8. CONCLUSIONES	32
9. BIBLIOGRAFÍA	34
10. ANEXO	40

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Título	Página
1	Estructura molecular de la testosterona y de la dihidrotestosterona.	4
2	Representación de la estructura primaria del receptor de andrógenos.	5
3	Vía de señalización canónica del receptor de andrógenos.	6
4	Vías de señalización no canónicas del receptor de andrógenos.	7
5	Principales mecanismos de resistencia asociados a la terapia de privación de andrógenos.	10
6	Estructura química de la bicalutamida.	11
7	Estructura química de la enzalutamida.	11
8	Mecanismos de acción de la enzalutamida.	12
9	Mecanismo de acción del yodo molecular.	14
10	Diseño experimental.	19
11	Efecto dosis-respuesta de los antiandrógenos en la viabilidad de las células LNCaP.	23
12	Curso temporal del efecto de los tratamientos en la viabilidad de las células LNCaP.	24
13	Efecto de los tratamientos en la viabilidad de las células LNCaP.	24
14	Efecto dosis respuesta de la bicalutamida en células DU-145.	25
15	Curso temporal del efecto de los tratamientos en la viabilidad de las células DU-145.	25
16	Efecto de los tratamientos en la expresión y activación de AR y PPAR γ en células LNCaP.	27
17	Efecto de los tratamientos en la expresión de mediadores del ciclo celular en células LNCaP.	28
18	Representación esquemática de los resultados.	33

Tabla	Título	Página
I	Principales fármacos usados en el tratamiento contra el cáncer de próstata.	9
II	Características de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR.	21

RESUMEN

El desarrollo y progresión del cáncer de próstata depende principalmente de la acción de los andrógenos, ya que estos promueven la sobrevivencia, proliferación e invasión de las células tumorales. Por lo tanto, las terapias contra esta enfermedad se basan en reducir la síntesis y/o efectos de estas hormonas. El uso de antagonistas es una estrategia ampliamente utilizada, sin embargo, en el mediano plazo estos fármacos generan resistencia. En términos de nuevas estrategias y con base en estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha documentado que el yodo molecular ejerce acciones antineoplásicas en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el prostático. Los mecanismos se están empezando a entender, pero en las células cancerosas que captan yodo, éste favorece la formación de un yodolípido (6-yodolactona) el cual interactúa con los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ). En el cáncer de próstata, la activación de PPAR γ induce el arresto del ciclo celular y la apoptosis, y existe la evidencia de que también inhibe la actividad del receptor de andrógenos (AR). Con base en esto, el propósito de este trabajo fue evaluar los efectos individuales y combinados, de la inhibición de la señalización androgénica y del yodo molecular, sobre la viabilidad celular y la expresión génica de proteínas que regulan el ciclo celular y participan en la transición G1/S.

El estudio se llevó a cabo en líneas celulares de cáncer de próstata, responsivas (LNCaP) y no responsivas a andrógenos (DU-145). Los antagonistas utilizados fueron la bicalutamida (Bic) y la enzalutamida (Enz). La viabilidad celular se evaluó con el ensayo de exclusión con azul tripano y la expresión génica mediante PCR (tiempo-real).

En la línea LNCaP y de manera individual ambos antagonistas del AR, y el yodo molecular redujeron la viabilidad celular de manera dosis-dependiente; con una concentración inhibitoria media (IC₅₀) para Bic, Enz y yodo molecular de 1.0, 0.4 y 200 μ M respectivamente. En los tratamientos combinados antagonista/yodo, se observó una reducción adicional del 15-20% en la viabilidad celular. Al analizar los mecanismos del bloqueo androgénico con bicalutamida, se encontró que este tratamiento no modificó la expresión de genes de arresto o proliferación celular; como p21, p27, ciclina E1, E2F-1 o PCNA, pero aumentó la expresión de ciclina E2 y ciclina D1. El yodo tampoco modificó la expresión de los genes antes mencionados a pesar del decremento en la viabilidad celular. En el tratamiento combinado de bicalutamida más yodo no se modificó la expresión de los inhibidores de cinasas (p21, p27) o de ciclinas (E1, E2, D1), pero disminuyó la expresión de E2F-1 y PCNA.

En conjunto, los efectos individuales de los tratamientos no involucraron cambios en la expresión génica de los inhibidores de cinasas (p21, p27), o efectores de la proliferación (E2F-1, PCNA), pero en el tratamiento combinado, disminuyó la expresión de estos últimos. Es probable que los efectos de los tratamientos en la viabilidad celular involucren cambios a nivel de proteína de los genes analizados, así como mecanismos de arresto del ciclo celular o apoptosis.

ABSTRACT

The development and progression of prostate cancer depends mainly on androgens, since they promote the survival, proliferation and invasion of tumor cells. Therefore, the therapies against this disease are based on reducing the synthesis and/or effects these hormones. The use of antagonists is a widely used strategy, however, in the medium term these drugs generate resistance. In terms of new strategies and based on *in vitro* and *in vivo* evidence, it has been documented that molecular iodine exerts antineoplastic actions in different types of cancer, including the prostatic. The mechanisms are beginning to be understood, but in cancer cells that take up iodine, it favors the formation of an iodolipid (6-iodolactone) that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor type gamma (PPAR γ). In prostate cancer, activation of PPAR γ induces cell arrest and apoptosis, and there is evidence that it also inhibits the activity of androgen receptor (AR). Based on this, the purpose of this work was to evaluate the individual and combined effects of the androgen signaling inhibition and molecular iodine on cell viability and on the expression of proteins that regulate the cell cycle and participate G1/S transition.

The study was conducted on prostate cancer cell lines, responsive (LNCaP) and non-responsive to androgens (DU-145). The antagonists used were bicalutamide (Bic) and enzalutamide (Enz). Cell viability was evaluated with trypan blue exclusion assay and gene expression by PCR (real-time).

In the LNCaP line individually, both AR antagonists and molecular iodine, reduced cell viability in a dose-dependent manner; with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for Bic, Enz and iodine, of 1.0, 0.4 and 200 μ M respectively. In the antagonist/iodine combination treatments, an additional 15-20% reduction in cell viability was observed.

When analyzing the mechanisms of androgen blockade with bicalutamide, it was found that this treatment did not modified the expression of arrest or cell proliferation genes; such as p21, p27, cyclin E1, E2F-1 or PCNA, but increased the expression of cyclin E2 and cyclin D1. Iodine also did not modify the expression of the aforementioned genes, despite the decrease in cell viability. In the combined treatment of bicalutamide plus molecular iodine, the expression of kinase inhibitors (p21, p27) or cyclin (E1) was not modified, but the expression of E2F-1 and PNCA decreased.

Taken together, the individual effects of the treatments did not involve changes in gene expression of kinase inhibitors (p21, p27), or proliferation effectors (E2F-1, PCNA), but in the combined treatment, the expression of these last did decrease. It is likely that the effects of the treatments on cell viability involve changes of the evaluated genes at protein level, as well as cell cycle arrest or apoptosis mechanisms.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata presenta una alta tasa de incidencia a nivel mundial y se estima que uno de cada siete varones será diagnosticado con esta enfermedad en el transcurso de su vida. Los andrógenos desempeñan un papel fundamental en la progresión del cáncer, promoviendo la sobrevivencia, proliferación e invasión de las células cancerosas. Ante ello, las terapias de elección contra el cáncer de próstata buscan reducir la síntesis o acción de estas hormonas. El uso farmacológico de antagonistas del receptor de andrógenos (AR) es una estrategia ampliamente utilizada en clínica, para controlar o erradicar con radio- o quimioterapia el cáncer; sin embargo, en el mediano y largo plazo se genera un estado de resistencia. La investigación en cáncer está enfocada en comprender los procesos de iniciación y progresión tumoral, que permitan eventualmente contar con estrategias de prevención, y mejorar el diagnóstico y la terapia.

En nuestro grupo estamos interesados en comprender los mecanismos de acción del yodo molecular en el proceso tumorigénico. En modelos de cáncer de próstata se ha mostrado que el epitelio canceroso capta yodo, y que este reduce la viabilidad celular a través de activar procesos apoptóticos. Existe la evidencia que el yodo puede mediar acciones directas sobre el estado redox; o bien participar en la yodación del ácido araquidónico y formación de 6-yodolactona. Este yodolípido actúa como agonista de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ) y en el cáncer de próstata está bien establecido que la 6-yodolactona y la activación de PPAR γ , reducen la viabilidad celular e inducen apoptosis. En el cáncer prostático, parte de los efectos de PPAR γ , han sido explicados a través de una regulación cruzada con la señalización de andrógenos. La activación del AR disminuye los niveles proteicos y actividad transcripcional del PPAR γ , mientras que la activación de PPAR γ disminuye la actividad transcripcional del AR. En función de estos hallazgos, el propósito de este estudio fue analizar los efectos individuales y combinados de la inhibición androgénica y yodo, en la viabilidad celular y en los posibles mecanismos. Es probable que los tratamientos conjuntos potencien la respuesta antineoplásica, lo que eventualmente podría permitir reducir la dosis de antiandrógenos, sus efectos secundarios y sus posibles mecanismos de resistencia. En este estudio se utilizaron líneas celulares de cáncer de próstata, responsivas (LNCaP) y no responsivas a andrógenos (DU-145) y el bloqueo androgénico se llevó a cabo con el uso de antagonistas selectivos de primera y segunda generación.

1. ANTECEDENTES

1.1. Morfología y función de la próstata

La próstata es una glándula exocrina túbulo alveolar de secreción mixta, cuyo desarrollo y función se encuentra bajo el control neuroendócrino y la acción de los andrógenos. Está presente en el tracto reproductor masculino de todos los mamíferos. Su función principal es captar, producir y secretar diversos componentes al semen; los cuales nutren, protegen, y mantienen la movilidad de los espermatozoides en el proceso de la fecundación (Veltri & Rodríguez, 2007). La unidad funcional de la próstata es el acino, y se encuentra conformada por diversos tipos celulares, entre los cuales destacan las células epiteliales (basales, neuroendócrinas y secretoras) y estromales (Marker *et al.*, 2003). La próstata humana se ubica entre el diafragma pélvico y la cavidad peritoneal, y cubre longitudinalmente a la uretra. Anatómicamente se clasifica en 3 zonas: central, de transición y periférica, las cuales son diferencialmente susceptibles a desarrollar patologías como hiperplasia prostática benigna y cáncer. En la mayoría de los casos, la hiperplasia se desarrolla en la zona de transición, mientras que el cáncer se desarrolla principalmente en la zona periférica (Lee & Akin-Olugbade, 2011).

1.2. Efectos de los andrógenos en la próstata

Los andrógenos participan en la diferenciación del tracto reproductor masculino, incluyendo la próstata y en la maduración sexual. En la figura 1 se muestra la estructura química de los andrógenos más activos, los cuales están representados por la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT). El 90 % de la testosterona circulante se produce en los testículos (por las células de Leydig) y el 10 % restante, se produce en la corteza adrenal. En comparación con la testosterona, la DHT presenta una afinidad dos o tres veces mayor por el receptor a andrógenos (AR), y es producida en tejidos periféricos, a partir de la testosterona por acción de la enzima 5 α -reductasa (Grino *et al.*, 1990).

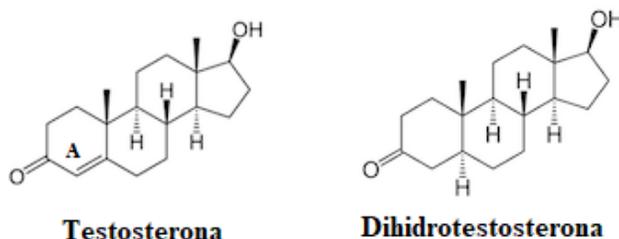


Figura 1. Estructura molecular de la testosterona y de la dihidrotestosterona. La testosterona posee un doble enlace en el anillo A, el cual es reducido por acción de la 5 α -reductasa/NADPH para producir la dihidrotestosterona (Grino *et al.*, 1990).

La próstata es una glándula de origen endodérmico cuyo desarrollo y función depende de andrógenos. Se desarrolla a partir del seno urogenital como producto de las acciones paracrinas que las células mesenquimales ejercen sobre las células epiteliales. Las células

mesenquimales o estromales poseen receptores a andrógenos y se conoce que su activación es determinante en la morfogénesis de la próstata. Las células del estroma inducen la secreción de un conjunto de factores de crecimiento, los cuales inducen la aparición, crecimiento y diferenciación de los primordios epiteliales, la ramificación del árbol ductal y la expresión de proteínas de secreción (Wen *et al.*, 2015). En la etapa adulta, los andrógenos mantienen la integridad y función de la próstata a través de regular la tasa de proliferación y muerte celular, así como mantener la actividad secretora de la glándula (Mirone *et al.*, 2006). Los efectos de los andrógenos han sido explicados a través de activar una vía canónica que involucra la activación de los receptores nucleares y su unión al ADN, pero también a través de mecanismos no canónicos que no involucran una interacción directa con el ADN (Leung & Sadar, 2017). Estas vías no son excluyentes y como se revisa más adelante, en algunos casos parecen ser complementarias.

1.2.1. Mecanismos de acción de los andrógenos

El receptor de los andrógenos (AR) es un factor de transcripción dependiente de ligando, que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares. En la figura 2 se muestra la estructura general del receptor, el cual está conformado por cuatro dominios funcionales: el dominio de unión a ligando (LBD), la región bisagra, el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio amino-terminal (NTD) (Schalken & Fitzpatrick, 2016). La activación del AR por sus ligandos puede activar vías intracelulares de señalización canónicas y no canónicas.



Figura 2. Representación de la estructura primaria del receptor de andrógenos. Adaptado de Tan *et al.*, 2015.

- Vía canónica

En ausencia de ligando, el AR se encuentra en el citoplasma unido a proteínas de choque térmico denominadas chaperonas (HSP90, HSP70 y p23) que le permiten mantener un estado inactivo, pero potencialmente funcional (Tan *et al.*, 2015). La unión del AR con su ligando (DHT o testosterona), desplaza a las proteínas de choque térmico, permitiendo al receptor actuar a través de su mecanismo canónico (Figura 3). El complejo hormona-receptor se fosforila, se transloca al núcleo, forma un homodímero e interactúa con los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) localizados en la región promotora de los genes blanco. La interacción del homodímero con los AREs, favorece el reclutamiento de proteínas correguladoras con función activadora o represora de la transcripción, lo que permite a los andrógenos regular procesos relacionados al control ciclo celular y apoptosis (Liao G. *et al.*, 2003).

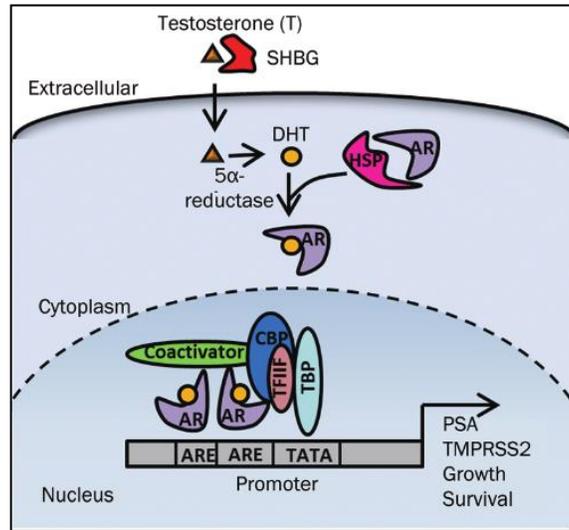


Figura 3. Vía de señalización canónica del receptor de andrógenos. Los andrógenos se unen a su receptor en citoplasma, desplazando a proteínas de choque térmico. El complejo hormona-receptor posteriormente es internalizado hacia el núcleo, forma un homodímero e interactúa con elementos responsivos a andrógenos en la región promotora de genes blancos, para así modular su transcripción. Diagrama obtenido de Tan *et al.*, 2015.

- Efectos de los andrógenos en el ciclo celular y en la apoptosis

Los andrógenos inducen la proliferación celular a través de promover la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S. Se conoce que algunos genes relacionados con los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas como p53 y p21 contienen sitios ARE en su región promotora (Lu *et al.*, 1997, 1999; Xu *et al.*, 2006, Schiewer *et al.*, 2012). Por otra parte, los andrógenos inducen la transcripción y aumentan los niveles proteicos de algunas ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), promoviendo así la formación de los complejos ciclina E/CDK2 y ciclina D/CDK2/4. La activación de estas cinasas conlleva a la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb), y su disociación del factor de transcripción E2F. Esta proteína en su forma libre se transloca al núcleo y regula la expresión de diversos genes involucrados en la proliferación celular, como PCNA, ciclinas E/A, CDK2, etc. Además, E2F induce la transcripción del AR y regula su propia expresión (Balk & Knudsen, 2008).

Además de los efectos proliferativos, los andrógenos estimulan la sobrevivencia celular e inhiben la apoptosis. El epitelio prostático expresa bajos niveles de Bcl-2, pero durante el desarrollo del proceso tumorigénico la expresión de este factor de sobrevivencia aumenta (Furuya *et al.*, 1996). En el cáncer prostático, la activación de la vía androgénica estimula la expresión de p21 y/o a la vía de MAPK/activación de Bcl-2 (Comstock & Knudsen, 2007).

- Vías no canónicas

Contrario a la vía canónica, los efectos de los andrógenos por vías no canónicas se pueden inducir en una temporalidad de minutos a horas; y no requieren que el AR sea translocado al núcleo o que interactúe con el ADN (Figura 4). A nivel citoplasmático, el complejo monomérico andrógeno/AR puede interactuar con diversos efectores de las vías: PI3K/Akt, Ras/Raft, Src, mTOR y activar la vía MAPK/ERK. (Liao R. *et al.*, 2013, Leung & Sadar, 2017). Adicionalmente, el complejo ligando/receptor puede activar mTOR y así promover la traducción de las ciclinas tipo D. La mayor disponibilidad de ciclinas, a su vez favorece la activación de las cinasas dependientes de ciclinas 4/6 (CDKs 4/6) que fosforilan e inactivan a la proteína de retinoblastoma, liberando así a varios miembros de la familia de factores de transcripción E2F. Otro mecanismo, involucra que el complejo monomérico andrógeno/AR puede inducir la degradación del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p27 (Schiewer *et al.*, 2012). Se ha propuesto que la activación de las vías no canónicas eventualmente favorece la activación de la vía canónica de andrógenos; denotando así la importancia del AR como un modulador de múltiples vías de señalización.

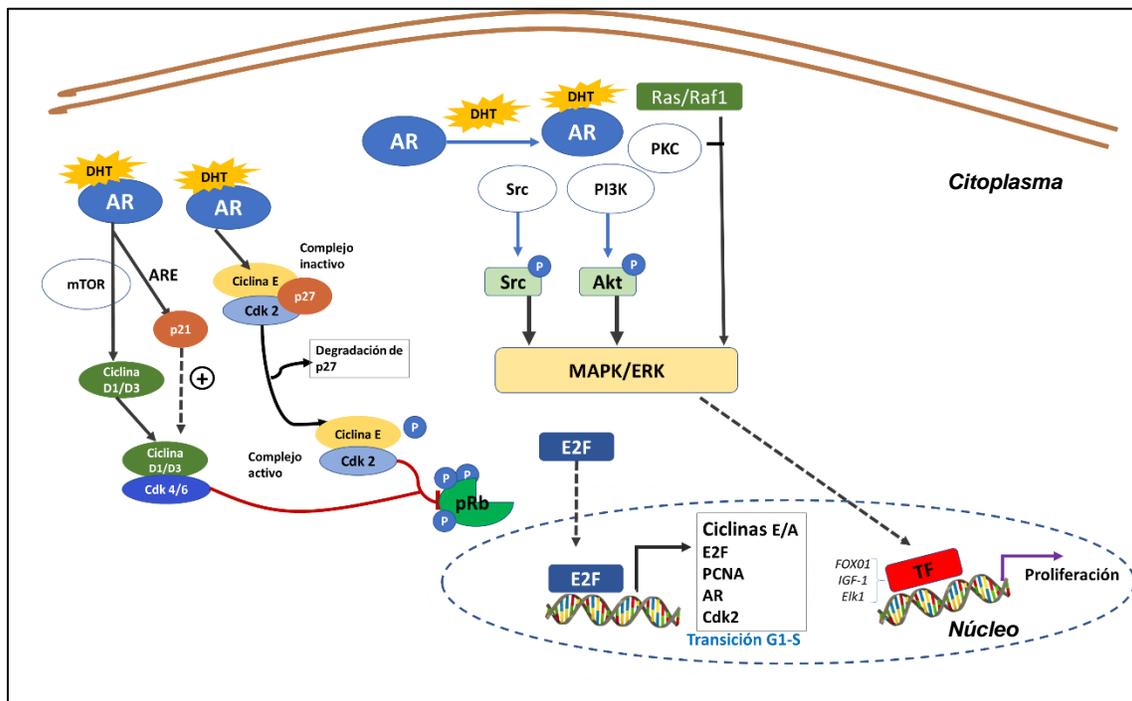


Figura 4. Vías de señalización no canónicas del receptor de andrógenos. La activación del AR puede inactivar a la proteína de retinoblastoma y subsecuentemente liberar a miembros de la familia de factores de transcripción E2F mediante incremento en la expresión de ciclinas tipo D, o degradación de proteínas que regulan la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Por otra, la activación del AR, mediante interacciones con múltiples efectores en el citoplasma puede activar río abajo a la vía MAPK/ERK, e inducir la expresión de diversos genes involucrados en la proliferación celular. Abreviaturas: AR: Receptor de andrógenos, Cdk: Cinasas dependientes de ciclinas, DHT: Dihidrotestosterona, ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares, MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos, PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular, pRb:

Proteína de retinoblastoma, TF: Factores de transcripción. Diagrama obtenido de Liao R. *et al.*, 2013 y Schiewer *et al.*, 2012.

1.3. Cáncer de próstata

En países occidentales, el cáncer de próstata ocupa el primer lugar de incidencia y el tercer lugar de mortalidad en varones mayores de 50 años (Siegel *et al.*, 2017). Aunque es una patología de origen multifactorial, se han identificado diversos factores de riesgo, que pueden favorecer su aparición y/o progresión. Estos se clasifican en factores de origen genético; que incluyen: mutaciones genéticas heredables (p. ej. HPC2, BRCA1, BRCA-2, etc.) (Rebbeck *et al.*, 2000; Castro & Eeles, 2012), susceptibilidad familiar y origen étnico; y en factores relacionados con el estilo de vida, como la obesidad, enfermedades de transmisión sexual, exposición a carcinógenos, etc. (Dong, 2006).

La mayoría de los cánceres prostáticos son de origen epitelial (adenocarcinomas) y se cree que su desarrollo inicia con la aparición local de lesiones intraepiteliales (PIN), las cuales pueden progresar a cáncer y generar metástasis, con tropismos principalmente a nódulos linfáticos y estructuras óseas.

1.3.1. Tratamientos

La estrategia terapéutica contra el cáncer de próstata depende del estadio de la enfermedad. En las etapas iniciales, cuando el tumor está confinado y las células están bien diferenciadas y organizadas, el tratamiento puede ir desde la no intervención (vigilancia médica), hasta el uso de intervenciones locales, como la prostatectomía y la radioterapia. Si el cáncer se encuentra en una etapa más avanzada (células menos diferenciadas, desorganización del acino con indicios de invasión), la terapia de elección es la de privación de andrógenos, cuyo fin es el de reducir la síntesis o efectos de estas hormonas, por medios quirúrgicos (castración) o farmacológicos.

El uso farmacológico de antiandrógenos, se basa en los estudios pioneros de Charles Huggins en 1941, quien mostró una disminución en los marcadores de progresión de cáncer de próstata (fosfatasa ácida y alcalina), cuando los pacientes se sometían a la cirugía de remoción de testículos, o a la administración de dosis suprafisiológicas de estrógenos (inhibición del eje hipófisis-gónada).

En la tabla 1 se muestran los principales fármacos utilizados como parte de la terapia de privación de andrógenos. Estos actúan a tres diferentes niveles: 1) inhibiendo o desensibilizando a nivel central el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, 2) inhibiendo la actividad de las enzimas responsables de la producción gonadal y adrenal de andrógenos y/o 3) bloqueando a los receptores responsables de la señalización androgénica (Denmeade & Isaacs, 2002).

Tabla I. Principales fármacos usados en el tratamiento contra el cáncer de próstata.

Fármaco	Nombre comercial	Categoría	Clasificación molecular	Mecanismo
INHIBICIÓN ANDROGÉNICA				
Acetato de megestrol	Megace	Inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal	Análogo de GnRH	Esteroide sintético, estructuralmente semejante a la progesterona. Inhibe la liberación de GnRH.
Leuprolida	Lupron		Análogo de GnRH	Agonista de GnRH, actúa como un inhibidor de las gonadotropinas (LH y FSH).
Acetato de abiraterona	Zytiga	Inhibidor de la síntesis de andrógenos	Inhibidor de la síntesis de andrógenos	Inhibidor irreversible de la enzima citocromo P450 17alfa-hidrolasa/17,20-liasa (CYP17). Previene la síntesis gonadal, adrenal y tumoral de testosterona.
Bicalutamida	Casodex	Anti-andrógeno no esteroideo (primera generación)	Antagonista del receptor andrógenos	Antagonista competitivo por el receptor a andrógenos.
Enzalutamida	Xtandi	Anti-andrógeno no esteroideo (segunda generación)	Antagonista del receptor andrógenos	Antagonista competitivo con el receptor a andrógenos. Presenta mayor afinidad respecto a la bicalutamida, y evita la translocación del receptor al núcleo.
QUIMIOTERAPIA				
Docetaxel	Taxotere	Quimioterapéutico (primera generación)	Taxano	Inducción de apoptosis. Previene la despolimerización de los microtúbulos requerida para la mitosis.
Cabazitaxel	Jevtana	Quimioterapéutico (segunda generación)	Taxano	Semejante a docetaxel, pero induce menos resistencia. Posee un mecanismo de residencia celular más eficiente, debido a su baja afinidad por los transportadores de expulsión (P-glicoproteína).

Recopilada de: Richie, 1999; Ayesha *et al.*, 2013; Mostaghel, 2014; Baciarello & Sternberg 2016.
 Abreviaturas: GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina, LH: Hormona luteinizante, FSH: Hormona estimulante del folículo.

En clínica, la terapia con antiandrógenos puede ser administrada como monoterapia, o acompañada de quimioterapia a base de taxanos: docetaxel, cabazitaxel, paclitaxel. Estos fármacos inhiben la mitosis, ya que interactúan con las unidades de β -tubulina y previenen la despolimerización de los microtúbulos, lo que conlleva a la apoptosis (Wang L. & Liu X. 1999). Sin embargo, independientemente de la opción farmacológica, en casi todos los pacientes, el cáncer progresa a un estado de resistencia a la castración, en el que las opciones terapéuticas son poco efectivas y se acompañan de un pronóstico poco prometedor.

Los pacientes que generan dicha resistencia; experimentan incrementos en los niveles séricos del antígeno específico prostático (PSA). El PSA es una enzima que pertenece a la familia de las calicreínas, cuya síntesis y secreción son reguladas directamente por la señalización de andrógenos. Se considera que la terapia con antiandrógenos es exitosa, cuando los pacientes presentan niveles de PSA, por debajo de los 0.2 ng/mL (Rodrigues *et al.*, 2006), y que un aumento de PSA es una señal de resistencia al tratamiento. Ante esta

situación se desarrolló una segunda generación de antiandrógenos, los cuales son efectivos en cánceres quimiorresistentes (Ceder, 2015).

La resistencia al tratamiento antiandrogénico involucra un mecanismo de selección clonal, bajo el cual las células cancerosas adquieren una mayor disponibilidad y/o sensibilidad a los andrógenos, así como mecanismos que permiten la activación del AR, por mecanismos independientes de andrógenos. Estos mecanismos de señalización aberrantes comprenden la sobreexpresión del AR, el surgimiento de variantes del AR constitutivamente activas, incluso en ausencia de ligando, la activación de AR por otros ligandos (p. ej. glucocorticoides o progesterona), supresión de proteínas supresoras de tumores, y/o la adquisición de fenotipos de mayor agresividad como el neuroendócrino. Todos estos mecanismos les confieren a las células tumorales una proliferación exacerbada, resistencia a la apoptosis y/o mayor invasividad (Drazer & Walter, 2016; Schalken & Fitzpatrick, 2016).

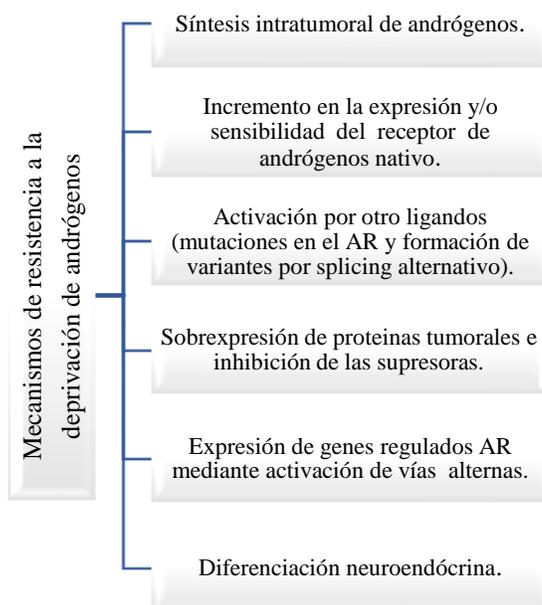


Figura 5. Principales mecanismos de resistencia asociados a la terapia de privación de andrógenos. Adaptada de: Fujimoto (2016).

1.3.2. Antiandrógenos

Dada la trascendencia de la señalización androgénica en la progresión del cáncer prostático, el uso de antiandrógenos; es una de las opciones de mayor relevancia clínica (Akakura *et al.*, 1998), siendo la bicalutamida y la enzalutamida los fármacos más utilizados.

1.3.2.1. Bicalutamida

En la figura 6 se muestra la estructura química de la bicalutamida, un antagonista no esteroideo de primera generación del receptor de andrógenos, empleado como tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer localizado. Este fármaco tiene una vida media > 5.8 días, es administrado de manera diaria por vía oral, puede ser administrado como monoterapia (150 mg/día) o en dosis menores (50 mg/día) al ser combinado con análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (Anderson, 2000).

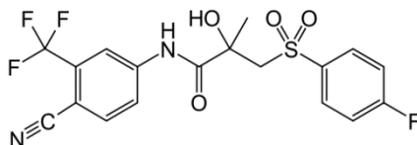


Figura 6. Estructura química de la bicalutamida.

La bicalutamida actúa como un antagonista competitivo por el dominio de unión al ligando del receptor de andrógenos y recluta proteínas correceptoras de los receptores nucleares como NCoR, lo que se traduce en una inhibición de la señalización y expresión de genes regulados por andrógenos. (Shang *et al.*, 2002). No obstante, y pese a su efectividad como tratamiento de primera línea, existe evidencia que el uso prolongado de este antagonista induce mecanismos de resistencia, favoreciendo el surgimiento de variantes del AR (con alteraciones en su dominio de unión a ligando), que permiten que la bicalutamida pueda actuar como un agonista (Hobisch *et al.*, 2000; Kawata *et al.*, 2010).

1.3.2.2. Enzalutamida

La enzalutamida es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración. Este fármaco se clasifica como un antiandrógeno no esteroideo de segunda generación, el cual compite con los andrógenos endógenos por el AR nativo y sus principales variantes (Figura 7). En comparación con la bicalutamida, presenta una mayor afinidad por el AR, su uso continuo no conlleva a presentar efectos agonistas, pero también puede presentar mecanismos de resistencia. Se ha propuesto que la enzalutamida impide que el AR sea fosforilado y que el complejo ligando/receptor sea internalizado al núcleo (Tran *et al.*, 2009).

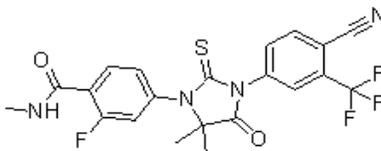


Figura 7. Estructura química de la enzalutamida.

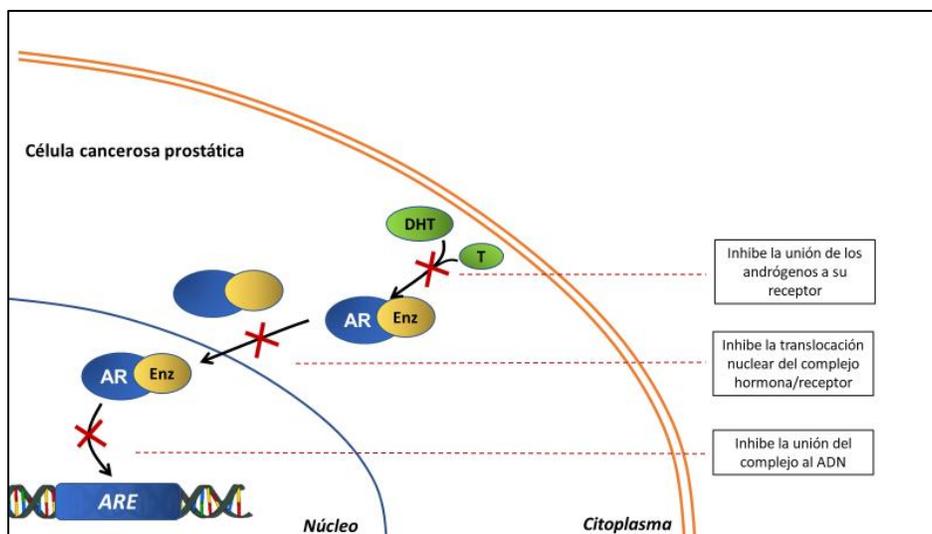


Figura 8. Mecanismos de acción de la enzalutamida. Abreviaturas: AR: Receptor de andrógenos, ARE: Elemento respuesta a andrógenos, DHT: Dihidrotestosterona, Enz: Enzalutamida, T: Testosterona. Información recopilada de Schalken & Fitzpatrick, 2016.

1.3.3. Efecto de los antiandrógenos en modelos de cáncer prostático

1.3.3.1. Estudios preclínicos

Estudios realizados en una línea celular de cáncer de próstata responsiva a andrógenos (LNCaP), mostraron que el tratamiento con bicalutamida reduce la proliferación celular e induce apoptosis. Estos hallazgos fueron confirmados *in vivo*, en los que el antagonista reduce el crecimiento del tumor en ratones inmunosuprimidos inoculados con estas células (Kawata *et al.*, 2010). De manera complementaria, estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la enzalutamida es 8 veces más potente que la bicalutamida para reducir la proliferación celular y el crecimiento tumoral (Tran *et al.*, 2009).

1.3.3.2. Estudios clínicos

Estudios clínicos de fase III han mostrado que no existen diferencias significativas en la esperanza de vida de los pacientes tratados con bicalutamida respecto a los pacientes castrados quirúrgicamente. Sin embargo, los primeros presentan menos efectos secundarios respecto a los pacientes sometidos a la castración quirúrgica (Kolvenbag *et al.*, 1998), por lo que generalmente se opta por el tratamiento farmacológico. Sin embargo y como ya se mencionó, la bicalutamida puede llegar a actuar como agonista del AR tras periodos prolongados de administración (aproximadamente 3 o 4 años), a través del surgimiento de mecanismos de resistencia (Hobisch *et al.*, 2000; Kawata *et al.*, 2010). Otro efecto indeseado es el incremento de la expresión y/o activación constitutiva de factores de troncalidad que favorecen la capacidad de invasión (Snail y Stat3) de las células tumorales. Estos mecanismos disminuyen la efectividad de los tratamientos de segunda opción, como sería la terapia con enzalutamida (Chengfei *et al.*, 2014; Ware *et al.*, 2016).

De manera análoga, estudios clínicos fase III en pacientes con cáncer de próstata metastásico tratados con enzalutamida, mostraron, una mayor supervivencia, mejoramiento de calidad de vida, y un retraso en la aparición de metástasis (Scher *et al.*, 2012; Beer *et al.*, 2014). Cabe destacar, que la enzalutamida, también induce mecanismos de resistencia como el surgimiento de variantes del AR constitutivamente activas (AR-V7) (Antonarakis *et al.*, 2014). Pese a esto, su administración siempre es precedida por antagonistas de primera generación como la bicalutamida, ya que el surgimiento de mecanismos de resistencia a enzalutamida, como el AR-V7, anula todo efecto de los antagonistas de primera generación (Del Re *et al.*, 2017).

1.4. Captura de yodo y efectos antineoplásicos

El yodo es un micronutriente esencial, que es internalizado y metabolizado primordialmente por la glándula tiroides, pero también por tejidos extra-tiroideos. Este halógeno es esencial para mantener la integridad estructural y funcional de los folículos tiroideos, y su función se está empezando a comprender, en tejidos como la mucosa gástrica, glándulas salivales, páncreas, glándula mamaria y próstata, (Spitzweg *et al.*, 1998; Aceves *et al.*, 2013).

En la naturaleza, el yodo puede estar presente en diversas formas químicas y ser captado a los tejidos por distintos mecanismos. El yoduro (I^-) es internalizado a través del cotransportador de Na^+/I^- (NIS), el transportador de pendrina (PDS) y/o canales de cloruro (Cl^-). Mientras que el yodo molecular (I_2) es internalizado mediante difusión facilitada (Shennam, 2001, Rillema *et al.*, 2003, & Arroyo-Helguera *et al.*, 2006).

Estudios epidemiológicos muestran que una elevada ingesta de alimentos ricos en yodo está asociada con un menor riesgo a desarrollar cáncer mamario y de próstata (Miller, 2006). En modelos *in vitro* con diversas líneas celulares de cáncer, se ha mostrado que, con diferente potencia, el yodo tanto en forma de yoduro como de yodo molecular reduce la proliferación celular e induce la apoptosis. Siendo el yodo molecular la forma química del yodo con mayores acciones antiproliferativas en modelos de células epiteliales cancerosas, el cual a dosis iguales resultó inocuo para las células epiteliales normales (Rösner *et al.*, 2009).

Los efectos del yodo molecular también han sido explorados *in vivo*. En un modelo de cáncer mamario se encontró que la coadministración de I_2 con doxorubicina sensibiliza el tumor ante el tratamiento del fármaco, resaltando la capacidad del I_2 como un agente adyuvante en otros tipos de neoplasias (Alfaro *et al.*, 2013).

En líneas de cáncer de próstata responsivas (LNCaP) y no responsivas (DU-145) a andrógenos, se caracterizaron los mecanismos de internalización del yodo en sus diferentes formas químicas, y se observó que ambos tipos de células prostáticas pueden captarlo en forma de I^- y de I_2 . Siendo el I_2 más potente que el I^- , en activar la vía intrínseca de apoptosis (incrementando el índice BAX/Bcl-2 y caspasas). Igualmente, cuando se suplementó por vía oral el I_2 , se observó una disminución en el crecimiento de xenotransplantes en ratones atímicos inoculados con células de cáncer prostático DU-145 (Aranda *et al.*, 2013).

1.4.1. Mecanismo de acción del yodo molecular

Existe la evidencia que el yodo puede actuar por al menos dos mecanismos:

- A. Mecanismo directo:** El yodo participa en el balance de oxido-reducción (redox) y dependiendo del contexto celular, el yodo puede mediar acciones antioxidantes u oxidantes. Estudios *in vivo* muestran que el yodo tiene la capacidad de normalizar el estado redox ante diversos estímulos oxidantes, pero también ejerce acciones pro-oxidantes a nivel mitocondrial, favoreciendo la apoptosis como consecuencia de una alteración del potencial de membrana. (Shrivastava *et al.*, 2006; Alfaro *et al.*, 2013; Quintero-García *et al.*, 2018).
- B. Mecanismo indirecto:** Involucra la yodación del ácido araquidónico (AA) a través de una reacción de halogenación en el carbono-6. Este proceso da lugar a la formación de un lípido yodado denominado 6-yodolactona (6-IL), que actúa como ligando activador de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ). Estudios *in vitro* en modelos de cáncer de próstata han mostrado efectos paralelos antiproliferativos y apoptóticos del I₂ y de la 6-IL. De manera independiente, ambos inducen la expresión de p53, p21, la activación de BAX y caspasas, y disminuyen la expresión de ciclina D1 y Bcl-2 (Arroyo-Helguera *et al.*, 2008; Aranda *et al.*, 2013), todos estos factores están relacionados con el control del ciclo celular y la apoptosis.

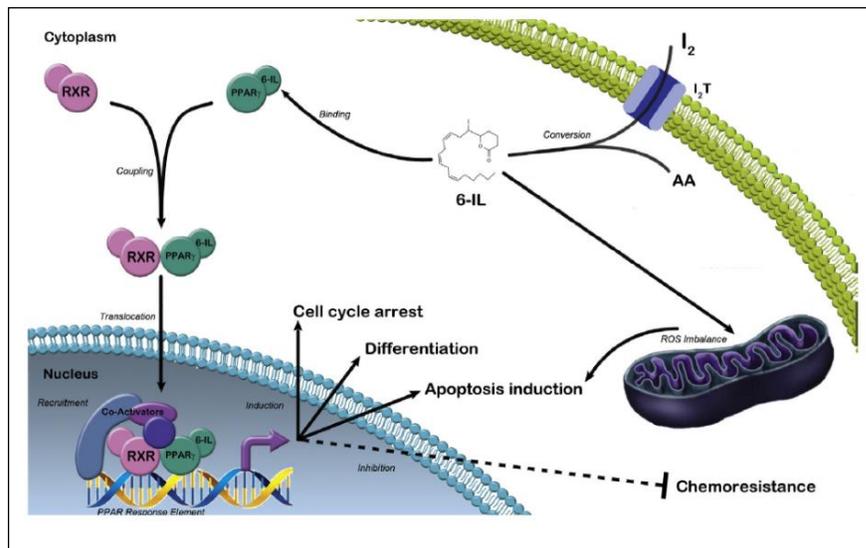


Figura 9. Mecanismo de acción del yodo molecular. La 6-yodolactona (6-IL) se produce a partir de la yodación del ácido araquidónico (AA). Este yodolípido puede inducir la apoptosis mediada por la mitocondria disipando su potencial de membrana mitocondrial, como respuesta a un desbalance de especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, la 6-IL puede activar los receptores PPAR γ y de esta manera regular la expresión de genes relacionados con procesos de proliferación, diferenciación celular y apoptosis. Abreviaturas: I₂: Yodo molecular, I₂T: Transportador de yodo molecular, PPAR γ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma, ROS: Especies reactivas de oxígeno y RXR: Receptor X retinoide. Diagrama obtenido de Nava-Villalba. & Aceves. 2014

1.5. PPAR γ y su señalización cruzada con AR

El PPAR γ es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares el cual puede ser activado por diversas moléculas de naturaleza lipídica como las prostaglandinas, ácidos grasos saturados e insaturados, como la 6-IL (Villacorta *et al.*, 2009). Este receptor está presente en el núcleo, y al activarse por ligando, forma un heterodímero con el receptor X retinoide (RXR). Este complejo interactúa con elementos de respuesta (PPREs), en la región promotora de los genes sensibles a PPAR γ . La activación del receptor induce la disociación de proteínas coactivadoras o correpresoras, regulando así la expresión de genes (Janani & Ranjitha, 2015). En el tejido prostático normal, los receptores PPAR γ actúan como reguladores de la diferenciación y supervivencia (Sikka *et al.*, 2012; Olokpa *et al.*, 2016), mientras que en ausencia de PPAR γ (modelo murino *knock-out* condicional), las células epiteliales prostáticas desarrollan lesiones precancerosas (Jiang *et al.*, 2004). De manera complementaria, en un modelo de células de carcinoma mamario (MCF-7) se demostró que la activación de PPAR γ con agonistas incrementa su propia expresión a nivel de mensajero y de proteína (Bonfiglio *et al.*, 2009).

Estudios en cáncer prostático y otros modelos han mostrado que existe una comunicación cruzada entre las vías de señalización del AR y PPAR γ . La activación del AR previene la diferenciación de adipocitos a través de reducir la expresión y los niveles proteicos de PPAR γ (Singh *et al.*, 2003). Mientras que en modelos *in vitro* de cáncer de próstata se ha observado que el uso de antagonistas del AR previene el decremento de PPAR γ inducido por la señalización de andrógenos (Olokpa *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha observado que la activación de PPAR γ disminuye la expresión de genes regulados por andrógenos (Nagata *et al.*, 2008).

Mecanismos epigenéticos parecen también estar involucrados en la regulación del AR sobre PPAR γ , ya que la activación del AR estimula la transcripción del microARN 27 (miR-27), y éste a su vez disminuye la traducción del mensajero de PPAR γ (Fletcher *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que analicen los efectos del I₂ en la expresión y/o señalización del AR.

1.5.1. Convergencia de la señalización PPAR γ y AR

La proteína supresora de tumores p53, es un blanco de la señalización del AR y de PPAR γ . En su región promotora p53 posee tanto elementos de respuesta a andrógenos (Pozzobon *et al.*, 2012), como un sitio de unión al factor nuclear- κ B (NF- κ B); por el cual PPAR γ puede competir e inducir la expresión de p53 (Bonfiglio *et al.*, 2006). Este aumento en la expresión de p53 por DHT o activación de PPAR γ ha sido mostrada en células LNCaP (Rokhlin *et al.*, 2005). A nivel funcional p53 modula una gran variedad de procesos celulares entre los que destacan: reparación de ADN, inhibición de angiogénesis, transición del ciclo celular G1/S y G2/M (Wawryk-Gawda *et al.*, 2013). Además, es capaz de modular la expresión de múltiples genes relacionados con el control de la proliferación (p21, p27, MDM2, etc.) y de la apoptosis; esto, tanto por la vía intrínseca (Bax, Bcl-2, Bcl-XL, Noxa, Puma, Bid) como por la extrínseca (Fas, TRAIL-R2, PIDD, DcR1, DcR2) (Reed, 2003; Marchenko *et al.*, 2000).

Otro blanco de interés de ambas vías es la proteína ciclina D1. Esta proteína regula el ciclo celular de la fase G1 a S mediante su interacción con las cinasas dependientes de ciclina 2 y 4. Se conoce que además de su rol canónico, ciclina D1 inhibe la actividad transcripcional del AR, mediante su interacción con el dominio N-terminal de este receptor (Olokpa *et al.*, 2017). Interesantemente, a nivel transcripcional, PPAR γ inhibe la expresión de ciclina D1 por mecanismos relacionados a CREB (Sharma *et al.*, 2004), mientras a nivel proteico ciclina D1 disminuye los niveles de PPAR γ (Wang *et al.*, 2003).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios experimentales y clínicos han dado resultados satisfactorios respecto a la seguridad y eficacia del uso de antagonistas de andrógenos contra el cáncer prostático; sin embargo, el surgimiento de mecanismos de resistencia sigue siendo un problema difícil de superar. Estudios de nuestro grupo han mostrado que el epitelio prostático tumoral capta yodo molecular y que este ejerce efectos antiproliferativos y apoptóticos a través de la formación de un yodolípido (6-yodolactona) activador de PPAR γ . Hasta el momento, no existen estudios que analicen los efectos del yodo molecular en la expresión o señalización del AR, pero se ha documentado que existe una relación inversa entre AR y PPAR γ . Los andrógenos inhiben la señalización de PPAR γ y la activación de PPAR γ inhibe la señalización del AR. Dado que las terapias contra el cáncer de próstata se basan primordialmente en reducir la señalización androgénica, en este estudio se pretende conocer si el tratamiento con yodo puede potenciar los efectos antiproliferativos de los antagonistas androgénicos (bicalutamida y enzalutamida). De presentarse una coadyuvancia, eventualmente el tratamiento con yodo molecular permitiría disminuir la dosis de antiandrógenos, y en consecuencia los efectos secundarios.

3. HIPÓTESIS

El tratamiento combinado de yodo molecular con antagonistas al receptor de andrógenos (bicalutamida o enzalutamida) inducirá efectos adyuvantes antiproliferativos en modelos *in vitro* de cáncer de próstata.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar en líneas celulares de cáncer prostático, los efectos individuales y combinados del yodo molecular y antagonistas de andrógenos en la viabilidad celular, y en la expresión de genes que regulan el ciclo celular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los efectos individuales y combinados del yodo molecular, bicalutamida y enzalutamida, en la proliferación de las células LNCaP (línea responsiva a andrógenos) y DU-145 (no-responsiva a andrógenos).
- Evaluar los efectos de los tratamientos sobre la expresión de los receptores AR y PPAR γ y de sus genes blanco (PSA y FABP4).
- Evaluar los efectos de los tratamientos en la expresión de genes que regulan el ciclo celular (ciclina D1, ciclina E1/E2, p21, p27, p53, E2F-1, PCNA, AR, PPAR γ),

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Líneas celulares

En el presente proyecto se emplearon dos líneas celulares representativas de cáncer de próstata provistas por la ATCC (LNCaP y DU-145). Ambas son de fenotipo epitelial adherente, sólo que la línea LNCaP es responsiva a andrógenos y poco invasiva, mientras que la línea DU-145 no es responsiva a andrógenos y es más invasiva.

La línea LNCaP fue establecida en 1980 por el J. Horoszewicz a partir de una metástasis de cáncer prostático a nódulo linfático. La línea DU-145 fue aislada en 1978 por Stone *et al.*, en 1978, a partir de una metástasis de cáncer de próstata en encéfalo. Existe evidencia de que esta línea expresa una variante trunca del receptor que la hace insensible a los andrógenos (Alimirah *et al.*, 2006).

5.2. Cultivo celular

La línea LNCaP se cultivó en medio RPMI-GlutaMAX (Gibco) complementado con suero fetal bovino (10%) y antibióticos; penicilina/estreptomicina (2%), mientras que la línea DU-145 se cultivó en medio DMEM-GlutaMAX (Gibco) complementado de la misma manera. Ambas líneas celulares se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂, t se cultivaron en placas adherentes (100 mm x 20 mm), realizando subcultivos antes de alcanzar la confluencia. El medio de cultivo se retiró por aspiración, y las células se lavaron con buffer salino de fosfatos (PBS, pH 7.4) antes de adicionar tripsina-EDTA (0.05% v/v). La tripsina se inactivó al añadir un volumen equivalente de medio de cultivo con suero fetal bovino y posteriormente el medio se recuperó y se centrifugo en tubos Falcon® de 15 ml a 2500 rpm por 3 minutos. El sobrenadante se retiró por aspiración, y el precipitado celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo, para cuantificar el número de células viables, mediante un contador automatizado (BioRad #145-0010). Todos los experimentos se realizaron en cultivos menores a 8 pasajes.

Los ensayos en los que se analizó los efectos de los tratamientos en la proliferación celular se realizaron en placas de 12 pozos y se utilizaron 70,000 células LNCaP/pozo y 40,000 células DU-145/pozo. Los ensayos en los que se analizó los efectos de los tratamientos en la expresión génica se realizaron en placas de Petri (100 mm x 15 mm) y se sembraron inicialmente 500,000 células LNCaP/placa y 300,000 células DU-145/placa.

5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se analizaron los efectos del I₂, bicalutamida, enzalutamida, I₂+bicalutamida o I₂+enzalutamida en la proliferación celular y en la expresión génica de algunos mediadores del ciclo celular y en los niveles del AR y PPAR γ . Primero, se analizaron los efectos dosis-respuesta de la bicalutamida (0.5 a 10 μ M) y enzalutamida (0.01 a 10 μ M). La bicalutamida es menos soluble que la enzalutamida, por lo que las concentraciones de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizadas para uno u otro antagonista fueron de 1.0% y 0.1% v/v, respectivamente. El DMSO estuvo presente en todos los experimentos a la concentración correspondiente. Con base en estudios previos de Aranda *et al.*, 2013, el yodo molecular se

administró a una concentración 200 μM , cuyo valor equivale a la concentración media inhibidora (IC_{50}). Ambos antiandrógenos se diluyeron en DMSO y dada la diferencia en solubilidad, la concentración final del vehículo fue del 1% para bicalutamida y 0.1% para enzalutamida. El medio de cultivo se renovó diariamente, junto con los todos los tratamientos.

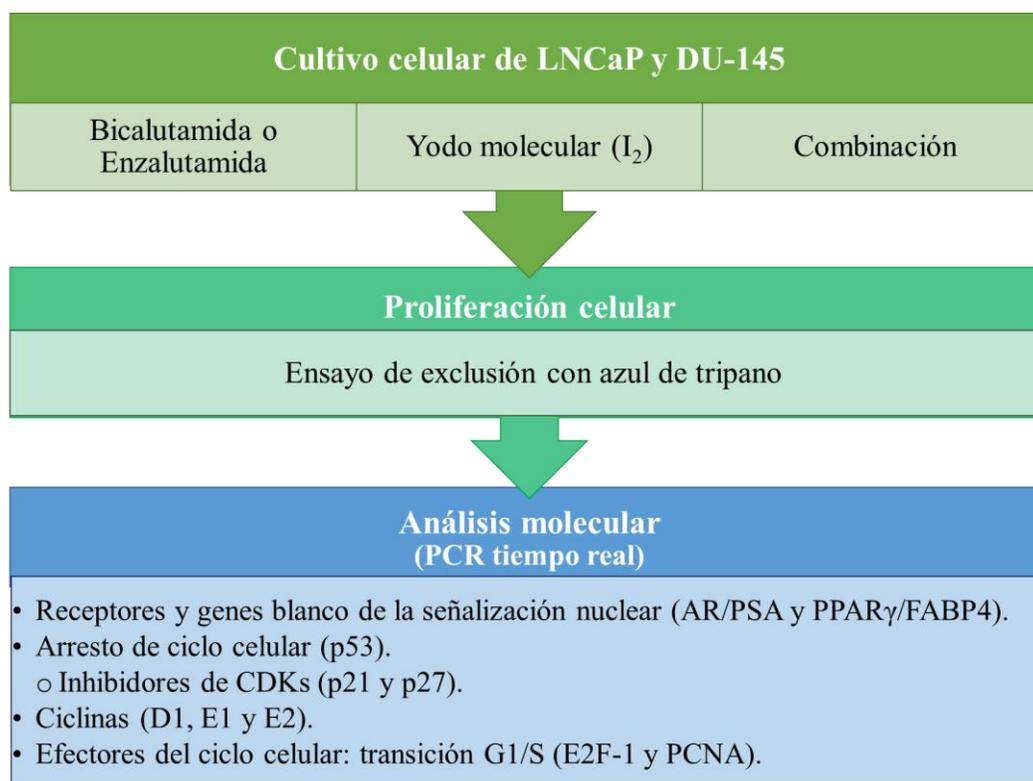


Figura 10. Diseño experimental

5.4. Ensayo de viabilidad celular

Los efectos de los tratamientos en la proliferación celular se analizaron a las 24, 48 72 y 96 horas de incubación. La cuantificación de las células vivas se realizó mediante el método de exclusión con azul de tripano, el cual permite diferenciar las células viables de las células muertas. Las células se tiñeron con azul de tripano (1:1) y el conteo se realizó utilizando una cámara de Neubauer y microscopía de luz. Este ensayo permite determinar el número de células vivas (no teñidas) y muertas (teñidas). La proliferación celular se determinó a partir del número inicial de células por unidad de tiempo. A partir de este procedimiento, se determinó la concentración inhibidora 50 (IC_{50}) para cada uno de los antagonistas androgénicos.

5.5. Análisis de la expresión génica mediante PCR tiempo real

- **Extracción y procesamiento de ARN**

La extracción del se realizó a partir de cultivos de LNCaP con 96 horas de tratamientos, empleando con el método de Trizol®-Cloroformo-Isopropanol. La integridad del ARN se

evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para identificar las subunidades del ARN ribosomal, y la pureza se determinó mediante un análisis espectrofotométrico. Solamente se utilizaron las muestras que presentaron integridad de ARN ribosomal, y cocientes de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm mayores a 2.0. Coeficientes menores a 2 indican contaminación con proteínas y compuestos aromáticos respectivamente.

- **Retrotranscripción del ARN a ADNc**

Esta reacción se llevó a cabo a partir de 2 µg de ARN/muestra y 1 µL de oligo Dt, en un volumen final de 15 µL con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 70° C por 5 minutos y posteriormente se colocó en hielo por 5 minutos. Se adicionó una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (DNTPs) (10 µM), inhibidores de ARNsas, dithiothréitol (DTT), enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega M170A) y buffer de reacción en un volumen final de 25 µL. Esta mezcla se incubó por 1 hora a 40° C.

- **Determinación de la temperatura de alineamiento**

Mediante un gradiente de temperatura en PCR de punto final de 40 a 45 ciclos, se determinó la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados en la PCR tiempo real (Tabla II). El tamaño de los productos de PCR se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3%.

- **PCR tiempo real**

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene 300 (Corbett Research) en un volumen final de 10 µL compuestos de: 1 µL de ADNc, 0.4 µL de oligonucleótidos 10 µM (sentido y antisentido), 5 µL de SyBR Green qPCR Master MIX (Fermentas), y 3.6 µL de agua desionizada libre de ADNasas. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C (30 segundos), temperatura alineamiento 55-62°C (30 segundos), y extensión 72°C (30 segundos). En todos los experimentos la especificidad de los oligonucleótidos se confirmó mediante el análisis de la curva de disociación o de “melt”, en la cual, la presencia de un solo pico confirmó la amplificación de un solo producto.

La expresión de los genes de interés se normalizó respecto a la expresión de β-actina como gen constitutivo para cada muestra. Los resultados se interpolaron y cuantificaron respecto a una curva de calibración de β-actina. El umbral del ciclo (Cq) en el cual se detectó la señal de amplificación de los productos se estableció en la región de amplificación exponencial de la señal fluorescente. El coeficiente de variación del gen constitutivo entre grupos fue menor al 15 % (Anexo 1). No se detectó amplificación en las reacciones de control negativo (sin ADNc).

Tabla II. Características de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR.

<i>Gen</i>	Clasificación / función	RefSeq ID (Gen Bank)	Secuencias	Producto (pares de bases)	Temp. alineamiento
AR	Factor de transcripción dependiente de ligando/Receptor nuclear	NM_000044.4 NM_001348063.1 NM_001348061.1 NM_001011645.3	S: GACCTTACGGGGACATGCG AS: TTCCTTCAGCGGCTCTTTT	175	62° C
PPAR γ	Factor de transcripción dependiente de ligando/Receptor nuclear	NM_138712.3 NM_015869.4 NM_138711.3 NM_005037.5 NM_001330615.1 NM_001354666.1 NM_001354667.1 NM_001354668.1 NM_001354669.1 NM_001354670.1	S: TCTCTCCGTAATGGAAGACC AS: GCATTATGAGACATCCCCAC	474	58° C
p53	Factor de transcripción/ arresto del ciclo celular e inductor de apoptosis.	NM_000546.5 NM_001126112.2 NM_001126113.2 NM_001126114.2 NM_001126115.1 NM_001126116.1 NM_001126117.1 NM_001126118.1	S: CCATGAGCGCTGCTCAGATA AS: GGGCACCACCACACTATGTC	124	60° C
p21	Inhibidor de CDKs	NM_000389.4 NM_078467.2 NM_001291549.1 NM_001220778.1 NM_001220777.1	S: GACCATGTGGACCTGTCACT AS: GCGGATTAGGGCTTCCTCTT	176	61° C
p27	Inhibidor de CDKs	NM_004064.4	S: ATGTCAAACGTGCGAGTGTC AS: TCTGTAGTAGAACTCGGGCAA	270	61° C
Ciclina D1	Proteína de ciclo celular/mitógeno	NM_053056.2	S: CCGTCCATGCGGAAGATC AS: GAAGACCTCCTCCTCGCA	75	60° C
Ciclina E1	Proteína de ciclo celular/mitógeno	NM_001238.3 NM_001322259.1 NM_001322261.1 NM_001322262.1	S: AAAATCGACAGGACGGCGAG AS: GGCTTGCACGTTGAGTTTGG	140	58° C
Ciclina E2	Proteína de ciclo celular/mitógeno	NM_057749.2	S: GAGAGGAGGTCACCAAGAAACA AS: ATAATGCAAGGACTGATCCCCC	85	55° C
FABP4	Gen responsivo a PPAR γ	NM_001442.2	S: GGGCCAGGAATTTGACGAAG AS: GGTGGTTGATTTCCATCCCAT	112	57° C
PSA	Gen responsivo a andrógenos	NM_001648.2 NM_001030047.1 NM_001030048.1	S: AAGCTGGAGGCACAACGCACC AS: CCTCCTTGGCTCACAGCCTTCTC	111	60° C
E2F1	Factor de transcripción / progresión del ciclo celular G1-S	NM_005225.2	S: GCTGGACCACCTGATGAATATCT AS: GTCTCAGGAGGGGCTTTGAT	156	61° C
PCNA	Replicación del ADN, proliferación celular, etc.	NM_002592.2 NM_182649.1	S: AAGTAATGTCGATAAAGAGGAGGA AS: TACTGAGTGTACCCTTGAAG	132	57° C
β -actina	Proteína de citoesqueleto	NM_001101.4	S: GTCCAGTATGCCTCTGGTCGTAC AS: CACGCTCGGTCAGGATCTTCATG	169	55-62° C

5.6. Análisis estadístico

Los grupos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguidas de una prueba de comparaciones múltiple (Tukey). Las diferencias estadísticas se consideraron a partir de valores de $p \leq 0.05$. Diferencias entre grupos se ilustran con letras diferentes. En nuestro estudio se observaron tendencias y fueron consideradas en la discusión, cuando estas presentaban un valor de $p > 0.5$ y ≤ 0.15 . Todos los análisis se realizaron en el software GraphPad Prism (v. 6.01).

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de los antiandrógenos en la viabilidad de las células LNCaP

En la figura 11, se muestra el efecto de dosis-respuesta de la bicalutamida y enzalutamida en la viabilidad de las células LNCaP a las 96 horas de tratamiento. Los resultados fueron normalizados respecto al grupo control, el cual creció en presencia de vehículo (DMSO). Los resultados muestran un evidente efecto dosis-respuesta, en el que se observa un valor teórico de IC_{50} de $1 \mu M$ para bicalutamida y de $0.4 \mu M$ para enzalutamida.

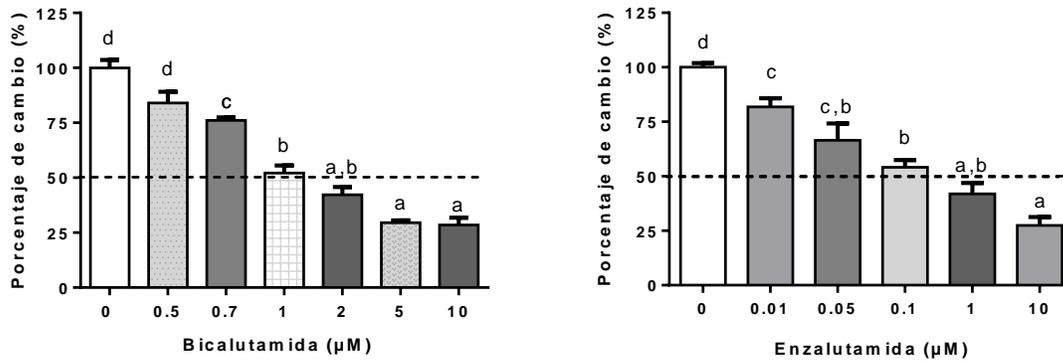


Figura 11. Efecto dosis-respuesta de los antiandrógenos en la viabilidad de las células LNCaP. Todos los tratamientos se administraron por 96 horas. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba Tukey de comparación múltiple. ($p < 0.05$). Las diferencias significativas se denotan con letras diferentes. Se muestran las medias con error estándar, $n = 3-5$ ensayos independientes por duplicado.

6.2. Perfil temporal del efecto de los tratamientos en la viabilidad de las células LNCaP

El efecto de los tratamientos individuales o combinados sobre la viabilidad celular se analizó a las 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento, utilizando las concentraciones respectivas de IC_{50} para bicalutamida ($1.0 \mu M$), enzalutamida ($0.4 \mu M$) y yodo molecular ($200 \mu M$). Los resultados fueron normalizados respecto al grupo control que sólo recibió vehículo. Como se esperaba, los resultados muestran que los tratamientos individuales redujeron la población celular a partir de las 24 o 48 horas de tratamiento, mientras que en los tratamientos combinados I_2 +bicalutamida o I_2 +enzalutamida, los efectos inhibidores fueron más evidentes a las 96 horas (Figura 12).

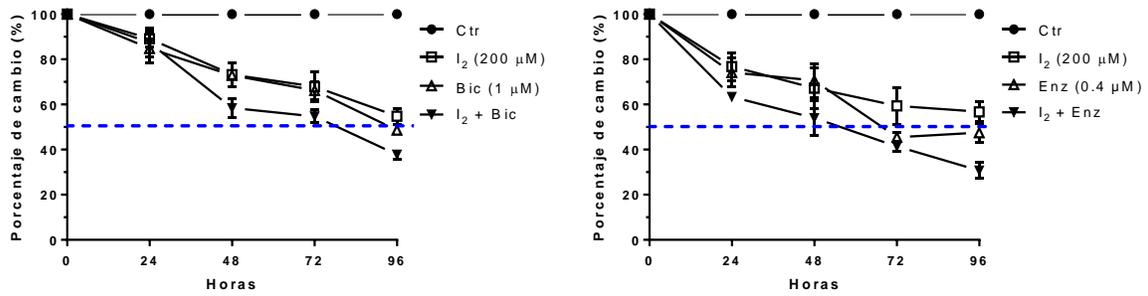


Figura 12. Curso temporal del efecto de los tratamientos en la viabilidad de las células LNCaP. Los resultados fueron normalizados respecto al grupo control que recibió DMSO como vehículo. 1% o 0.1% para los ensayos de bicalutamida o enzalutamida, respectivamente. Se muestra la media con error estándar, $n=5$ ensayos independientes por duplicado. Abreviaturas: Bic: bicalutamida, Enz: enzalutamida y I_2 : yodo molecular.

En la figura 13, se muestra el análisis estadístico a las 96 horas de tratamientos. Con los tratamientos individuales se observó una reducción en la viabilidad celular de alrededor del 50%, mientras que con los combinados se observó una reducción significativa del 64% y 70% en los ensayos de bicalutamida y enzalutamida respectivamente.

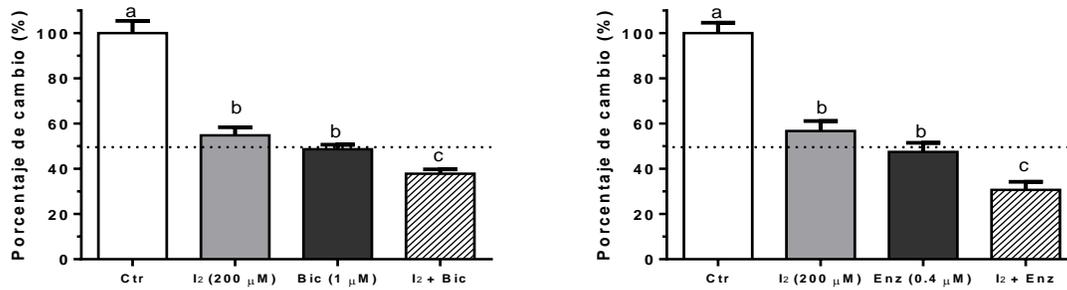


Figura 13. Efecto de los tratamientos en la viabilidad de las células LNCaP. Todos los tratamientos se administraron por 96 horas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. ($p<0.05$). Letras diferentes representan diferencias significativas. $n = 5$ ensayos por duplicado. Se muestran las medias con error estándar. Abreviaturas: Bic: bicalutamida, Enz: enzalutamida, I_2 : yodo molecular.

6.3. Efecto dosis-respuesta de la bicalutamida en la viabilidad de las células DU-145

En la figura 14 se muestra que ninguna de las concentraciones de bicalutamida tuvo efectos en la viabilidad celular a las 96 horas de tratamiento. Los valores de todos los tratamientos fueron normalizados respecto a sus grupos control de cada experimento independiente (vehículo DMSO, 1%), y se expresan como porcentaje de cambio. Los resultados obtenidos confirmaron la no-dependencia de la línea DU-145 a la señalización androgénica.

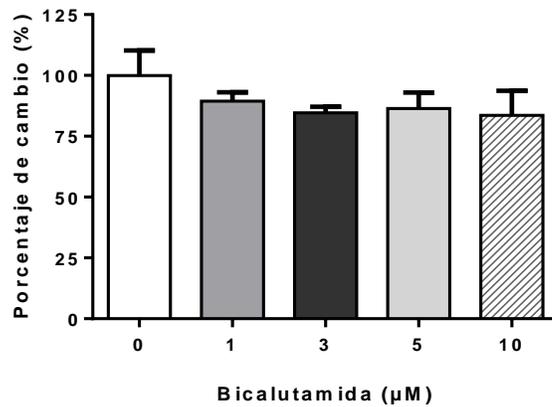


Figura 14. Efecto dosis respuesta de la bicalutamida en células DU-145. Los resultados fueron normalizados respecto al grupo control tratado con vehículo (1% DMSO), los tratamientos se administraron por 96 horas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. $n = 3$ ensayos independientes por duplicado. Se muestra la media con error estándar.

6.4. Perfil temporal de los tratamientos en la viabilidad de las células DU-145

En la figura 15 se muestra el efecto de los tratamientos individuales y combinados sobre la viabilidad celular. Los resultados fueron normalizados respecto al grupo control que recibió vehículo (1% DMSO) y se observó que ni la bicalutamida, ni el yodo molecular a una dosis de 400 μM, disminuyeron significativamente la viabilidad celular. Sin embargo, en el grupo combinado se observó una disminución significativa, respecto al grupo control, pero no respecto a los tratamientos individuales.

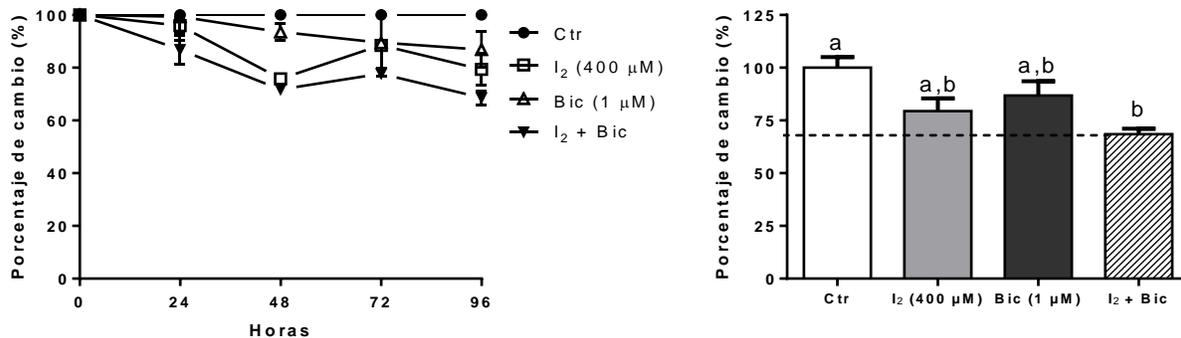


Figura 15. Curso temporal del efecto de los tratamientos en la viabilidad de las células DU-145. El grupo control recibió 1% de DMSO como vehículo. En el panel de la derecha se muestra el análisis estadístico a las 96 horas de tratamiento. Se realizó una prueba ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey. $n=3-5$ ensayos independientes por duplicado. Se muestra la media con error estándar. Abreviaturas: Bic: bicalutamida, I₂: yodo molecular.

El análisis molecular de los efectos de los tratamientos se realizó únicamente en las células LNCaP, dado que en las células DU145 no se observaron efectos coadyuvantes.

6.5. Efecto de los tratamientos en la señalización del AR y PPAR γ en células LNCaP

Los resultados de la figura 16 muestran que ninguno de los tratamientos modificó los niveles de expresión (ARNm) del AR a las 96 horas de tratamiento. Al analizar la expresión de un gen blanco de la señalización de andrógenos (PSA), se observó una disminución significativa en el grupo con tratamiento combinado respecto al grupo control, pero no respecto a los tratamientos individuales.

Con respecto a la vía de PPAR γ , se observó que ningún tratamiento modificó su expresión. Al analizar la expresión de un gen blanco de esta vía como es la proteína 4 de unión a ácidos grasos (FABP4), se encontró una alta variabilidad y que sus niveles de expresión fueron muy bajos, cercanos al límite de detección del ensayo.

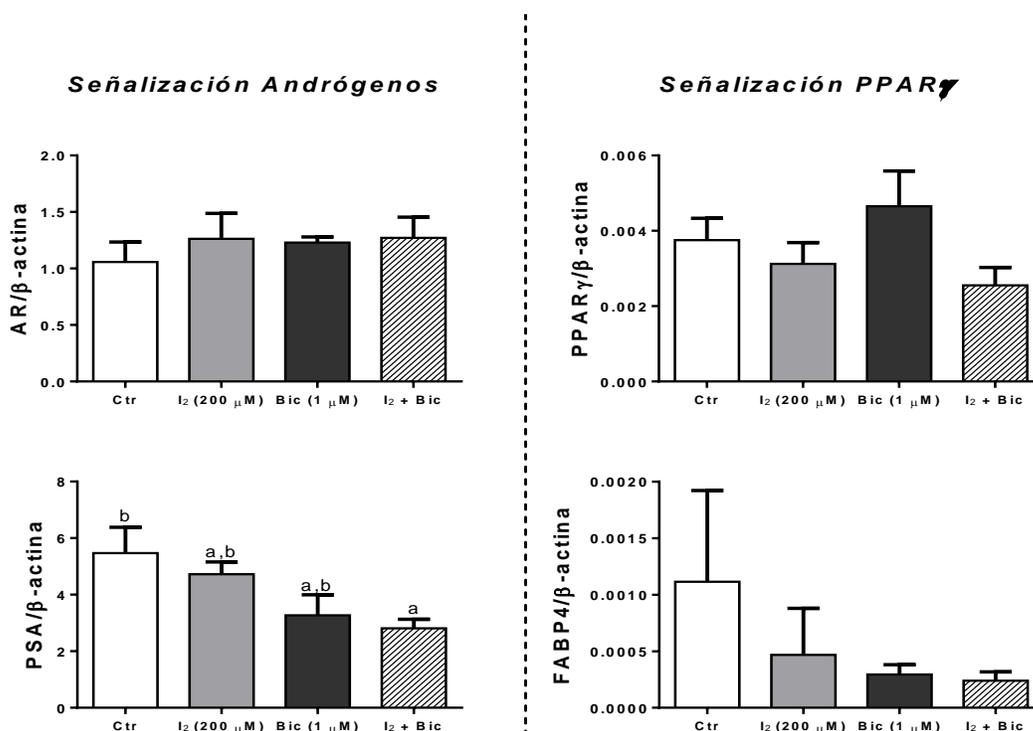


Figura 16. Efecto de los tratamientos en la expresión y activación de AR y PPAR γ en células LNCaP. Todos los tratamientos se administraron por 96 horas, la expresión génica de los receptores nucleares y de sus genes blancos respectivos, se analizó mediante PCR tiempo real. Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes denotan diferencias estadísticas ($p < 0.05$). $n = 4$ ensayos independientes por duplicado. Se muestran las medias con error estándar. Abreviaturas: Bic: bicalutamida, I₂: yodo molecular.

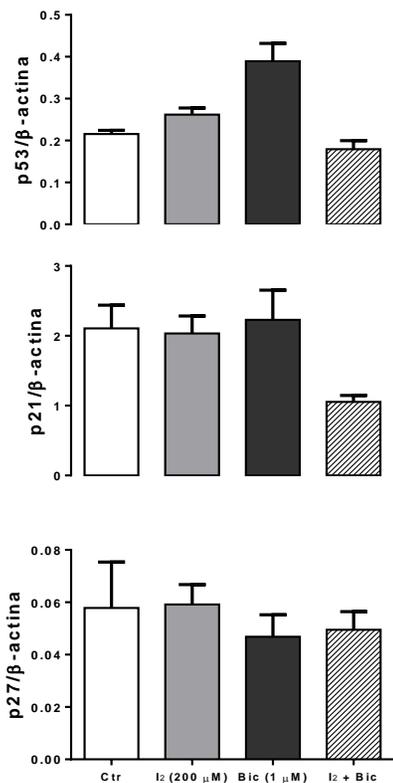
6.6. Expresión de mediadores del ciclo celular en células LNCaP

Los resultados de la figura 17 muestran los efectos de los tratamientos en la expresión de genes de ciclo celular que participan primordialmente en la fase G1 a S. Específicamente se

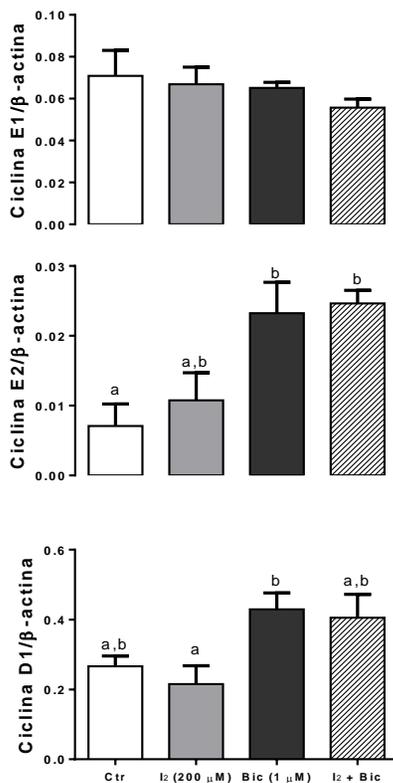
analizó la expresión de p53, de los inhibidores de cinasas (p21 y p27), de ciclinas (E1, E2 y D1) y de algunos factores de transcripción como E2F-1 y PCNA.

Los resultados muestran que ninguno de los tratamientos modificó significativamente los niveles de expresión de los inhibidores de cinasas. Sin embargo, se observó una tendencia de la bicalutamida a aumentar la expresión de p53 respecto al grupo control ($p=0.1326$). Ninguno de los tratamientos modificó la expresión de ciclina E1, pero la bicalutamida sola y combinada aumentó significativamente la expresión de ciclina E2 y ciclina D1. Aunque ni el yodo molecular ni la bicalutamida modificaron la expresión de E2F-1, se observó una reducción no significativa en el tratamiento combinado respecto al tratamiento individual con el antiandrógeno ($p=0.1697$). Ninguno de los tratamientos individuales modificó la expresión de PCNA, pero hubo una tendencia de la bicalutamida y del grupo combinado de a disminuir su expresión.

Inhibidores del ciclo celular



Ciclinas



Efectores del ciclo celular

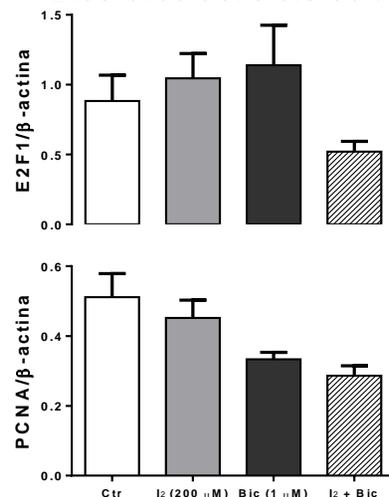


Figura 17. Efecto de los tratamientos en la expresión de mediadores del ciclo celular en células LNCaP. Todos los tratamientos se administraron por 96 horas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey, respuestas estadísticamente diferentes, se ilustran con letras desiguales ($p < 0.05$). $n \geq 4$ ensayos por duplicado. Se muestran las medias con error estándar. Abreviaturas: Bic: bicalutamida, I₂: yodo molecular.

7. DISCUSIÓN

Está establecido que la proliferación y sobrevivencia de las células de cáncer de próstata depende de andrógenos, ya que estos promueven la proliferación celular a través de inducir la expresión de múltiples tipos de ciclinas y la degradación de los inhibidores de cinasas, favoreciendo la transición del ciclo celular de G1/S (Knudsen *et al.*, 1999). Ante ello, el propósito del presente trabajo fue evaluar los efectos individuales y combinados de los antagonistas del receptor de andrógenos, con el yodo molecular, en la viabilidad celular y en la expresión de algunos mediadores del ciclo celular.

En las células LNCaP se evaluaron los efectos de la bicalutamida y de la enzalutamida en la viabilidad celular y se encontró una inhibición dosis-dependiente por parte de los fármacos, congruente con otros trabajos (Quéro *et al.*, 2010; Hoffman-Censits & Kelly, 2013). La bicalutamida presentó un IC₅₀ teórica de 1.0 μM y la enzalutamida de 0.4 μM , siendo esta última, 2.5 veces más potente que la bicalutamida. Este valor contrasta con lo publicado por otros autores, quienes reportan una actividad de enzalutamida 10 veces mayor respecto a Bic (Clegg *et al.*, 2012; Guerrero *et al.*, 2013; Moilanen *et al.*, 2015). Esta diferencia puede deberse a que los estudios no son estrictamente comparables. En la mayoría de ellos, la actividad de los antagonistas se evalúa en respuesta a un estímulo androgénico; mientras que, en el presente estudio, el bloqueo androgénico se realizó en condiciones basales, emulando la terapia. A nivel molecular el tratamiento con 1.0 μM de bicalutamida, no modificó la expresión del AR, pero si hubo una tendencia de disminuir la expresión de PSA, efecto que se potencio en el tratamiento combinado con yodo molecular, sugiriendo una mayor inhibición de la señalización androgénica.

La regulación del AR por andrógenos es compleja, y estudios en células LNCaP sugieren que estos favorecen la eficiencia de traducción de su ARNm (Krongrad *et al.*, 1991). En el presente estudio, el bloqueo androgénico con bicalutamida, no modificó la expresión del AR, lo cual es congruente con estudios previos, en los cuales el tratamiento con antiandrógenos solo decrementa la actividad transcripcional del AR (Khurana *et al.*, 2016). La bicalutamida no modificó los niveles de expresión de p21, p27, ciclina E1, E2F-1, o PCNA, pero contrario a lo esperado, aumentó la expresión de ciclina E2, ciclina D1, y hubo una tendencia de incrementar p53. Las proteínas p21 y p27 actúan como inhibidores de las CDKs (cinasas dependientes de ciclinas), y están relacionadas con procesos como arresto del ciclo celular y se conoce que su expresión génica y vida media proteica están directamente reguladas por andrógenos (Lu *et al.*, 1999; Rokhlin *et al.*, 2005; Schiewer *et al.*, 2012). En nuestro estudio el bloqueo androgénico no modificó la expresión de estos genes, pero se requiere analizar los niveles proteicos de estos reguladores. La inhibición de la señalización androgénica no correlacionó con una disminución en la expresión de ciclinas, ni con una disminución en la expresión de PCNA o E2F-1. Estos resultados indican que los efectos de la bicalutamida sobre la viabilidad celular no parecen estar mediados por el control transcripcional de estos genes, o al menos no en la dosis empleada en el presente trabajo. Se conoce que la administración del antagonista, a una concentración mayor (100 μM) inhibe que las células transiten de la fase G1 hacia la S, a través de inhibir la expresión de factores relacionados con la pre-replicación del ADN (Bai *et al.*, 2005), o a

través de la activación de p53 (Bouchal *et al.*, 2005) ambos arrestan a las células. En el presente trabajo se observó una tendencia ($p=0.1326$) de bicalutamida a aumentar p53, por lo que una perspectiva es evaluar mediante ensayos funcionales y/o Western-Blot la participación de p53 en respuesta a los tratamientos. En esta tesis, no se midieron los niveles proteicos de las ciclinas, pero es importante enfatizar que además de su contribución al ciclo celular, a través de interacciones proteína-proteína, la ciclina D1 puede inhibir la señalización androgénica, mientras que ciclina E2 puede promoverla (Comstock *et al.*, 2009, 2011; Yamamoto *et al.*, 2000). En términos generales los resultados indican que la disminución de la viabilidad celular mediada por bicalutamida, no modificó la expresión génica de proteínas clave en la transición G1/S y aunque aumentó la expresión de las ciclinas D1 y E2, esto no se reflejó en cambios en la expresión de un efector directo de proliferación, como PCNA.

En relación con los efectos del yodo molecular, estudios en células LNCaP han mostrado que este induce apoptosis por caspasas a través de aumentar la relación Bax/Bcl-2 (Aranda *et al.*, 2013). En este estudio se analizó por primera vez, los efectos del yodo molecular en la expresión y/o niveles de mediadores del ciclo celular que participan en la fase G1/S. La concentración de yodo molecular utilizada fue de 200 μM equivalente al IC_{50} previamente reportado (Aranda *et al.*, 2013). Como se esperaba el yodo molecular redujo la viabilidad celular, sin embargo, a semejanza con bicalutamida, no modificó los niveles de expresión de los genes analizados: p53, inhibidores de ciclinas (p21, p27), ciclinas (D1, E1, E2), o efectores de proliferación (E2F, PCNA). En otros tipos de cáncer se ha mostrado que el yodo molecular induce arresto celular y esto se refleja en un aumento en los niveles proteicos de p53 y p21 (Arroyo-Helguera *et al.*, 2008; Aceves *et al.*, 2009). Por otra parte, se encontró que el yodo molecular aumentó la expresión de AR, sin embargo, esto no se reflejó en una mayor expresión de PSA (su gen blanco). En cuanto a la señalización de $\text{PPAR}\gamma$, está bien establecido que la expresión de FABP4 se regula de manera directa por este factor de transcripción (Tontonoz & Spiegelman, 2008), por lo que se analizó su expresión con el propósito de evaluar los efectos del yodo molecular en la activación de $\text{PPAR}\gamma$. Sin embargo, la expresión de $\text{PPAR}\gamma$ no se modificó, y los niveles de expresión de FABP4 estuvieron cerca del límite de detección y lo que no nos permitió concluir al respecto. Estudios en curso analizan a nivel proteico $\text{PPAR}\gamma$, así como la expresión de otros genes blanco, con mayor abundancia en próstata.

Un hallazgo importante fue que la inhibición en la señalización de andrógenos con uno u otro antagonista complementado con el tratamiento con yodo molecular disminuyó la viabilidad celular de un 15 a un 20% adicional, respecto a los tratamientos individuales. Interesantemente, se observó que a pesar de que los tratamientos no incidieron de manera significativa en la expresión de los inhibidores de cinasas, ni de las ciclinas, se observaron tendencias de reducción en la expresión de los efectores E2F-1 y PCNA respecto al grupo control ($p=$ y $p=$ respectivamente) sugiriendo acciones antiproliferativas del tratamiento combinado. Para dilucidar en que punto del ciclo inciden los tratamientos, estudios en curso analizan a nivel proteico algunos de los intermediarios evaluados por PCR.

Se observaron cambios interesantes en la expresión del AR y de su actividad transcripcional en respuesta a los tratamientos complementados con yodo molecular, y pese a que no se observaron cambios en la señalización de PPAR γ a nivel transcripcional, los resultados obtenidos no permiten descartar su participación, ya que la regulación bidireccional entre el AR y PPAR γ es compleja, pues además de sus propios mecanismos, los receptores nucleares comparten coactivadores (PGC-1 α) y correpresores (NCoR y SRMT) (Yu *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2002; Liao G. *et al.*, 2003; Shiota *et al.*, 2010). La competencia por estos correguladores puede favorecer que en determinado contexto cada vía esté “activada” o “inactivada”. Estudios de nuestro grupo en cáncer de próstata analizan la contribución de PPAR γ y del AR en los efectos del yodo.

En términos generales, los efectos de los tratamientos individuales y combinados fueron contundentes en relación con la viabilidad celular y aunque las vías no son del todo comprendidas (se requiere evaluar a nivel proteico a varios intermediarios), también resulta de interés explorar los mecanismos de arresto celular (G₀) y de apoptosis, pues existe evidencia que el bloqueo androgénico y el tratamiento con yodo pueden inducir en estos mecanismos (Floyd *et al.*, 2009; Aranda *et al.*, 2013). Otra perspectiva que resulta de interés es evaluar los efectos de los tratamientos con dosis equivalentes al IC₂₅, con el propósito de determinar si la coadyuvancia se pierde, se mantiene o se potencia y extender estos estudios a la enzalutamida. Finalmente, los antagonistas no modificaron la viabilidad de las células DU-145, confirmando la insensibilidad de éstas a la acción de los andrógenos.

8. CONCLUSIONES

- En las células LNCaP, los tratamientos individuales con bicalutamida, enzalutamida o yodo molecular, disminuyeron la viabilidad celular y estos efectos se potenciaron en el tratamiento combinado (bicalutamida más yodo), sugiriendo efectos antiproliferativos, de arresto celular y/o apoptosis.
- Los tratamientos individuales no disminuyeron la expresión de los genes de proliferación, por lo que los efectos en la viabilidad celular podrían estar regulados a nivel de la proteína.
- El tratamiento combinado mostró una disminución no significativa en los niveles de expresión de los factores E2F-1 y PCNA, por lo que se requieren más estudios para comprender los mecanismos implicados.

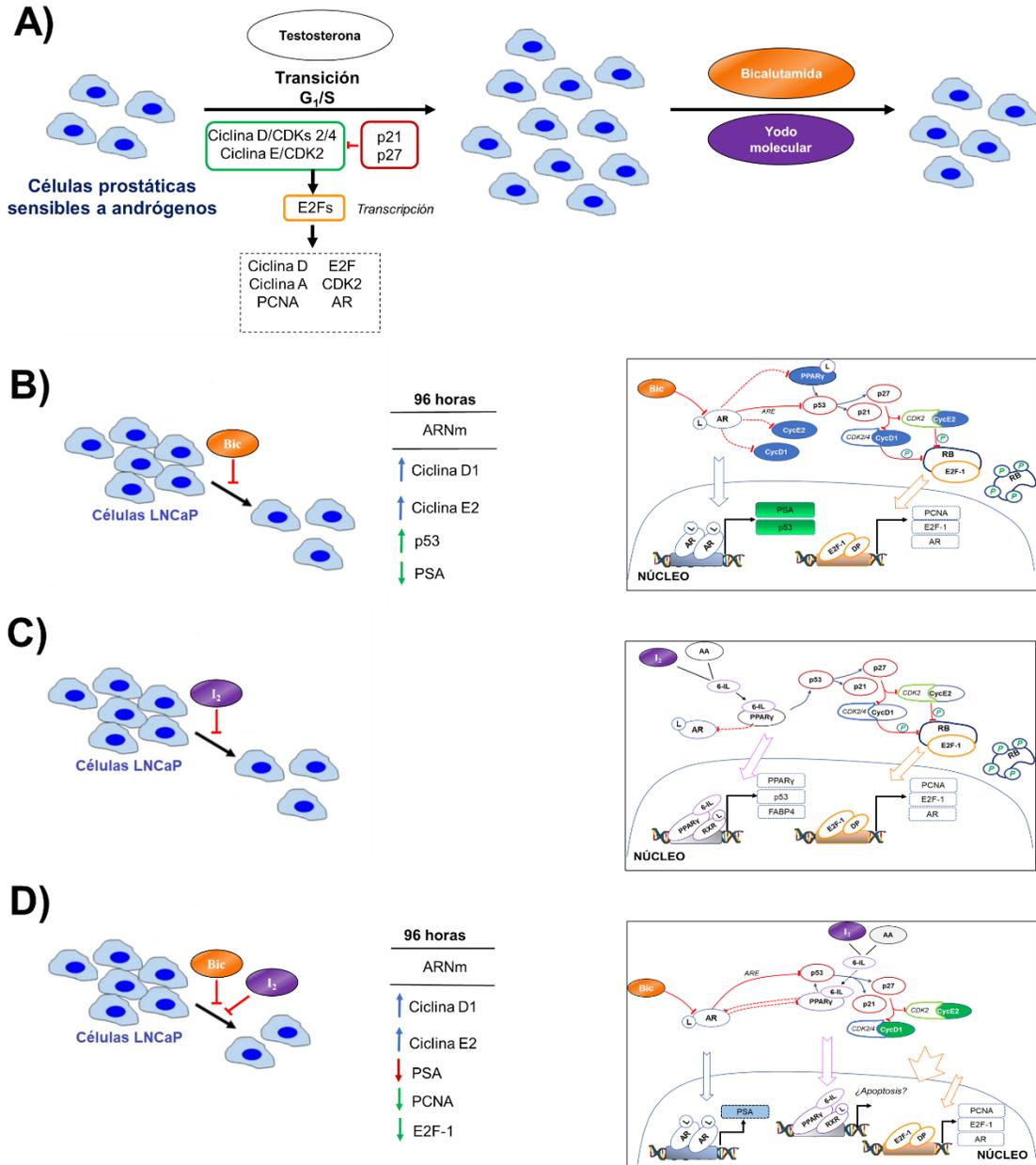


Figura 18. Representación esquemática de los resultados. **A)** La testosterona regula la progresión del ciclo celular y favorece la proliferación celular, a través de inducir la expresión de ciclinas, promover la degradación de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas e inducir la actividad de los factores de transcripción E2F. **B-C)** El bloqueo androgénico y el yodo tras 96 horas de tratamiento redujeron la viabilidad celular, y en ambos casos no correlacionó con una disminución en la expresión de ciclinas o aumento en los inhibidores de las CDKs. **D)** El tratamiento combinado redujo de manera adyuvante la viabilidad celular respecto a los tratamientos individuales; y aunque en esta respuesta no disminuyó la expresión de ciclinas, sí redujo a los efectores del ciclo celular, sugiriendo una acción antiproliferativa. Se requieren más estudios que examinen los efectos de los tratamientos a nivel de proteína. Flecha azul y rojo representa incrementos y decrementos respectivamente, mientras que flecha verde indica tendencia ($p < 0.15$). Abreviaturas: Bic: Bicalutamida, CDK: Cinasa dependiente de ciclinas, I₂: Yodo molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- Aceves C., Anguiano B., & Delgado G. (2013). The Extrathyronine Actions of Iodine as Antioxidant, Apoptotic, and Differentiation Factor in Various Tissues. *Thyroid*. 23: 938-946.
- Akakura K., Fururuya Y., & Ito H. (1998). Steroidal and nonsteroidal antiandrogens: chemical structures, mechanisms of action and clinical applications. *Nihon Rinsho*. 56: 2124-2128.
- Alfaro Y., Delgado G., Cárabez A., Anguiano B., & Aceves C. (2013). Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Molecular Cancer*. 12: 45.
- Alimirah F., Chen F., Basrawala Z., Win H., & Choubey D. (2006). DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett* *ers*. 580: 2294-2300.
- Anderson J. (2000). Bicalutamide treatment for locally advanced prostate cancer. *Hospital Medicine*. 61: 660-663.
- Antonarakis E., Changxue L., Wang H., *et al.*, (2014). AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 371: 1028-1038.
- Aranda N., Sosa S., Delgado G., Aceves C., & Anguiano B. (2013). Uptake and Antitumoral Effects of Iodine and 6 -Iodolactone in Differentiated and Undifferentiated Human Prostate Cancer Cell Lines. *The Prostate*. 73: 31-41.
- Arroyo-Helguera O., Anguiano B., Delgado G., & Aceves C. (2006). Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocrine-Related Cancer*. 13: 1147-1158.
- Arroyo-Helguera O., Rojas E., Delgado G., & Aceves C. (2008). Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocrine-Related Cancer*. 15: 1003-1011.
- Ayesha A., Aihue E., & Weigel N. (2013). Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 140: 223-238.
- Baciarello G., & Sternberg C. (2016). Treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) with enzalutamide. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 106: 14-24.
- Bai V., Cifuertes E., Menon M., Barrack E., & Reddy G. (2005). Androgen receptor regulates Cdc6 in synchronized LNCaP cells progressing from G1 to S phase. *Journal of cellular physiology*. 204: 281-287.
- Balk S., & Knudsen K. (2008). AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nuclear Report Signaling*. 6: 1-12.
- Beer T., Armstrong A., Rathkopf D. *et al.*, (2014). Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*. 371: 424-33.
- Bonofiglio D., Aguila S., Cralano S., *et al.*, (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*. 12: 3083-3092.
- Bonofiglio D., Cione E., Qi H., *et al.*, (2009). Combined low doses of PPARgamma and RXR ligands trigger an intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells. *The American Journal of Pathology*. 175: 1270-1280.

- Bouchal J., Baumforth K., Sváňová M., Murray E., *et al.*, (2010). Microarray analysis of bicalutamide action on telomerase activity, p53 pathway and viability of prostate carcinoma cell lines. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 57: 83-92.
- Castro E., & Eeles R. (2012). The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*. 14: 409–414.
- Ceder J. (2015). Targeting the Mechanisms of Progression in Castration-resistant Prostate Cancer. *European Urology*. 67: 480-481.
- Cheng S., Brzostek S., Lee S., Hollenberg A., & Balk S. (2002). Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Molecular endocrinology*. 16:1492-1501.
- Chengfei L., Yezi Z., Wei L., Yuan C., *et al.*, (2014). Inhibition of constitutively active Stat3 reverses enzalutamide resistance in LNCaP derivative prostate cancer cells. *Prostate*. 74: 201-209.
- Clegg N., Wongvipat J., Joseph J., Tran C., Ouk S., Dilhas A., *et al.*, (2012). ARN-509: a novel antiandrogen for prostate cancer treatment. *Cancer Research*. 72:1494-1503.
- Comstock C., & Knudsen K. (2007). The Complex Role of AR Signaling After Cytotoxic Insult: Implications for Cell Cycle Based Chemotherapeutics, *Cell Cycle*. 6: 1307-1313.
- Comstock C., Augello M., Benito R., Karch J., *et al.*, (2009). Cyclin D1 splice variants: polymorphism, risk, - and isoform-specific regulation in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 15: 5338–5349.
- Comstock C., Augello M., Schiewer M., Karch J., *et al.*, (2011). Cyclin D1 is a selective modifier of androgen-dependent signaling and androgen receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*. 286: 8117-8127.
- Del Re M., Biasco E., Crucitta S., Derosa L., Rofi E., *et al.*, (2017). The Detection of Androgen Receptor Splice Variant 7 in Plasma-derived Exosomal RNA Strongly Predicts Resistance to Hormonal Therapy in Metastatic Prostate Cancer Patients. *European Urology*. 71: 680-687.
- Denmeade S., & Isaacs J. (2002). A history of prostate cancer treatment. *Nature reviews. Cancer*. 2: 389-396.
- Dong J. (2006). Prevalent mutations in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 91: 433-447.
- Drazer M., & Walter M. (2016). The Role of Testosterone in the Treatment of Castration Resistant Prostate Cancer. *The Cancer Journal*. 22: 330-33
- Fletcher C., Dart., Sita-Iumdem., Cheng H., Rennie P., & Bevan C. (2012). Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. *Human Molecular Genetics*. 14: 3112-3127.
- Floyd M., Teahan S., Fitzpatrick J., & Watson R. (2009) Differential mechanisms of bicalutamide-induced apoptosis un prostate cell lines. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 12: 52-33.
- Fujimoto N. (2016). Role of the Androgen-Androgen Receptor Axis in the Treatment Resistance of Advanced Prostate Cancer: From Androgen-Dependent to Castration Resistant and Further. *Journal of UOEH*. 38: 129-138.
- Furuya Y., Krajewski S., Epstein J., Reed J., & Isaacs J. (1996). Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. *Clinical Cancer Research*. 2: 389-398.
- Guerrero J., Alfaro I., Gómez F., Protter A., & Bernales S. (2013). Enzalutamide, an androgen receptor signaling inhibitor, induces tumor regression in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. 73: 1291-1305.

- Grino P., Griffin K., & Wilson J. (1991). Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*. 126: 1165-1172.
- Hobisch A., Hoffmann J., Lambrinidis L., Eder I., Bartsch G., Klocker H., & Culig Z. (2000). Antagonist/Agonist Balance of the Nonsteroidal Antiandrogen Bicalutamide (Casodex) in a New Prostate Cancer Model. *Urologia Internationalis*. 65: 73-79.
- Hoffman-Censits J., & Kelly K. (2013). Enzalutamide: a novel anti-androgen for patients with castrate resistant prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 19: 1335-1339.
- Horoszewicz J., Leong s., Kawinski E., Karr J., Rosenthal H., *et al.*, (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research*. 43: 1809-1818.
- Huggins C., & Hodges C. (1941). Studies on prostatic cancer: The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research*. 1: 293-297.
- Janani C., & Ranjitha B. (2015). PPAR gamma gene – A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 9: 46–50.
- Jiang M., Shapell S., & Hayward S. (2004). Approaches to understanding the importance and clinical implications of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) signaling in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 91: 513-527.
- Kawata H., Ishikura N., Watanabe M., Nishimoto A. Tsunenari T., & Aoki Y. (2010). Prolonged treatment with bicalutamide induces androgen receptor overexpression and androgen hypersensitivity. *Prostate*. 70: 745-754.
- Khurana N., Talmar S., Chandra P., Sharma P., *et al.*, (2016). Sulforaphane increases the efficacy of anti-androgens by rapidly decreasing androgen receptor levels in prostate cancer cells. *International journal of oncology*. 19: 1609-1619.
- Knudsen K., Arden K., Cavenee W. (1999). Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 20213-20222.
- Kolvenbag G., Blackledge G., & Gotting-Smith K. (1998). Bicalutamide (Casodex) in the Treatment of Prostate Cancer: History of Clinical Development. *The Prostate*. 34: 61-72.
- Krongrad A., Wilson C., Wilson J., Allman D., & McPhaul M. (1991). Androgen increases androgen receptor protein while decreasing receptor mRNA in LNCaP cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 76: 79-88.
- Lee C., & Akin-Olugbade O. (2011). Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*. 40: 565-575.
- Leung J., & Sadar M. (2017). Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 8:2.
- Liao G., Chen L., Zhang A., Godavarthy A., Xia F., *et al.*, (2003). Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *The Journal of biological chemistry*. 278: 5052-5061.
- Liao R., Shihong M., Miao L., Li R., Yin Y., & Raj G. (2013). Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Translational Andrology and Urology*. 2(3): 187-196.
- Lu S., Tsai S., & Ming-Jer T. (1997). Regulation of Androgen-dependent Prostatic Cancer Cell Growth: Androgen Regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 Genes. *Cancer Research*. 57: 4511-4516.

- Lu S., Liu M., Epner D., Tsai S., & Ming-Jer T. (1999). Androgen Regulation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 Gene through an Androgen Response Element in the Proximal Promoter. *Molecular Endocrinology*. 3: 376-384.
- Marchenko N., Zaika A., & Moll U. (2000). Death Signal-induced Localization of p53 Protein to Mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 275: 16202-16212.
- Marker P., Donjacour A., Dahiya R., & Cunha G. (2003). Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology* 253: 165-174.
- Moilanen A. Riikonen R., Oksala R., Ravanti L., Aho E., *et al.*, (2015). Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies. *Scientific reports*. 3:5:120007. doi: 10.1038/srep12007.
- Mostaghel E. (2014). Abiraterone in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Management and Research*. 6: 39-51.
- Miller D. (2006). Extrathyroidal Benefits of Iodine. *Journal of American Physicians and Surgeons*. 11: 106-110.
- Mirone V., Fusco F., Verze P., Schulman C., Debryne F., & Imbimbo C. (2006). Androgens and Benign Hyperplasia. *European Urology Supplements*. 4:410-417.
- Nagata D., Hashimoto Y., Nakanishi M., Naruyama H., Okada S., *et al.*, (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor γ and growth inhibition by its ligands in prostate cancer. *Cancer Detection and Prevention*. 32: 259-266.
- Nava-Villalba M., & Aceves C. (2014). 6-Iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 112: 27-33.
- Olokpa E., Bolden A., & Stewart L. (2016). The Androgen Receptor Regulates PPAR γ Expression and Activity in Human Prostate Cancer Cells. *Journal of Cellular Physiology*. 231: 2664-2672.
- Olokpa E., Moss P., & Stewart L. (2017). Crosstalk between the Androgen Receptor and PPAR Gamma Signaling Pathways in the Prostate. *PPAR Research*. 2017:9456020. doi: 10.1155/2017/9456020.
- Pozzobon A., Shneider L., & Brum I. (2012). Androgen-modulated p21 and p53 gene expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary cultures. *International Journal of Molecular Medicine*. 30: 967-973.
- Quéro L., Giocanti N., Henneguïn C., & Favaudon V. (2010). Antagonistic interaction between bicalutamide (Casodex) and radiation in androgen-positive prostate cancer LNCaP cells. *Prostate*. 70: 401-411.
- Quintero-García M., Delgado-González E., Sánchez-Tusie A., Vásquez M., Aceves C., & Anguiano B. (2018). Iodine prevents the increase of testosterone-induced oxidative stress in a model of rat prostatic hyperplasia. *Free Radical Biology and Medicine*. 115: 298-308.
- Rebeck T., Walker A., Zeigler-Johnson C., Weisburg M., Nathanson K., *et al.* (2000). Association of HPC2/ELAC2 Genotypes and Prostate Cancer. *The American Journal of Human Genetics*. 67: 1014-1019.
- Reed J. (2003). Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell*. 3: 17-22.
- Rodríguez N., Chen M., Catalona W., Roehl K., Richie J., & D'Amico A. (2006). Predictors of mortality after androgen-deprivation therapy in patients with rapidly rising prostate-specific antigen levels after local therapy for prostate cancer. *Cancer*. 107: 514-520.

- Rokhlin O., Taghiyev A., Guseva N., Glover R., Chumakov P., Kravchenko J., & Cohen M. (2005). Androgen regulates apoptosis induced by TNFR family ligands via multiple signaling pathways in LNCaP. *Oncogene*. 24: 6773-6784.
- Rösner H., Tottemante P., Möller W., & Gärther R. (2009). Antiproliferative / Cytotoxic Activity of Molecular Iodine and Iodolactones in Various Human Carcinoma Cell Lines. No Interfering with EGF-signaling, but Evidence for Apoptosis. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 117: 1-10.
- Richie J. (1999). Anti-androgens and other hormonal therapies for prostate cancer. *Urology*. 54: 15-19.
- Rillema J., & Hill M. (2003). Pendrin transporter carries out iodide uptake into MCF-7 human mammary cancer cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 228: 1078-1082.
- Schalken J., & Fitzpatrick J. (2016). Enzalutamide: targeting the androgen signaling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU International*. 117: 215-225.
- Shang Y., Myers M., & Brown M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular cell*. 9: 601-610.
- Sharma C., Pradeep A., Pestell R., & Rana B. (2004). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activation Modulates Cyclin D1 Transcription via β -Catenin-independent and cAMP-response Element-binding Protein-dependent Pathways in Mouse Hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 16927-16938.
- Scher H., Fizazi K., Saad F., *et al.*, (2012). Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*. 367: 1187-1197.
- Schiewer M., Augello M., & Knudsen K. (2012). The AR dependent cell cycle: Mechanisms and cancer relevance. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 352: 34-45.
- Shennan D. (2001). Iodide transport in lactating rat mammary tissue via a pathway independent from the Na⁺/I⁻ cotransporter: evidence for sulfate/iodide exchange. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 280: 1359-1363.
- Shiota M., Yokomizo A., Tada Y., Inokuchi J., Tatsugami K., *et al.*, (2010). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 α Interacts with the Androgen Receptor (AR) and Promotes Prostate Cancer Cell Growth by Activating the AR. *Molecular Endocrinology*. 24: 114-127.
- Shrivastava A., Tiwari M., Sinha R., *et al.*, (2006). Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 19762-19771.
- Siegel R., Miller K., & Jemal A. (2017) Cancer Statistics, 2017. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*. 67: 7-30.
- Sikka S., Chen L., Sethi G., & Kumar A. (2012). Targeting PPAR γ Signaling Cascade for the Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *PPAR Research*. 968040. doi: 10.1155/2012/968040.
- Singh R., Artaza J., Taylor W., Gonzalez-Cadavid N., & Bhasin S. (2003). Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology*. 144: 5081-5088.
- Spitzweg C., Joba W., Eisenmenger W., & Heufelder A. (1998). Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 83:
- Stone K., Mickey D., Wunderli H., Mickey G., & Paulson D. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International journal of cancer*. 21: 274-281.

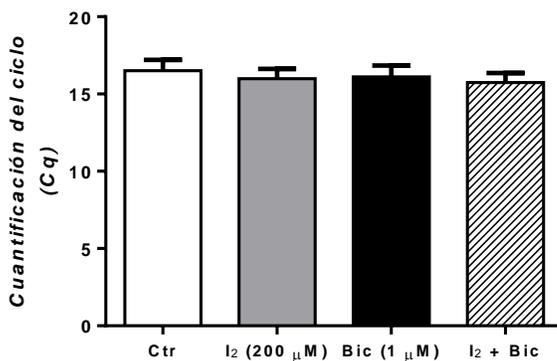
- Tan M., Li J., Eric H., Melcher K., & Yong E. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 36: 3-23.
- Tontonoz P., & Spiegelman B. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annual Review of Biochemistry*. 77: 289-312.
- Tran C., Ouk S., Clegg N., *et al.*, (2009). Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Science*. 324: 787-790.
- Veltri R., & Rodriguez R. *Campbell-Walsh Urology*. Novena edición, capítulo 85: 2717-2719.
- Villacorta L., Schopfer F., Zhang J., Freeman B., & Chen E. (2009). PPAR γ and its ligands: therapeutic implications in cardiovascular disease. *Clinical Science*. 116: 205-218.
- Wang C., Parrabiraman N., Zhou J., Fu M., Sakamaki T., *et al.*, (2003). Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation. *Molecular and cellular biology*. 23: 6159-6173.
- Wang L., & Liu X. (1999). The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 44: 355-36.
- Ware K., Somarelli J., Schaeffer D., *et al.* (2016). Snail promotes resistance to enzalutamide through regulation of androgen receptor activity in prostate cancer. *Oncotarget*. 7: 50525-50536.
- Wawryk-Gawda E., Chylińska-Wrzos P., Lis-Sochocka M., *et al.* (2013). P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma*. 251: 525-533.
- Wen S., Hong-Chiang C., Jing T., Zhiquan S., Yuanjie N., & Chawnshang C. (2015). Stromal Androgen Receptor Roles in the Development of Normal Prostate, Benign Prostate Hyperplasia, and Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology*. 185: 293-301.
- Xu Y., Chen R., Ross K., & Balk S. (2006) Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Research*. 66: 7783-7792.
- Yamamoto A., Hashimoto Y., Kohri K., Ogata E., *et al.*, (2000). Cyclin E as a Coactivator of the Androgen Receptor. *The Journal of Cell Biology*. 4: 873-880.
- Yu C., Markan K., Temple K., Deplewski D., *et al.*, (2005). The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 13600–13605.

BIBLIOGRAFÍA ELECTRONICA

American Type Culture Collection:

- LNCaP: www.atcc.org/Products/All/CRL-1740.aspx
- DU-145: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-81.aspx>

ANEXO



Grupo	Cq ± desv. estandar
Control (DMSO 1% v/v)	16.51 ± 1.96
Yodo molecular (200 μM)	15.98 ± 1.82
Bicalutamida (1 μM)	16.10 ± 2.08
Combinación	15.74 ± 1.75

Anexo 1: Valores de Cq para determinar la expresión de β-actina en PCR tiempo real. El valor de Cq representa el ciclo mínimo de detección de la señal fluorescente. Se muestran las medias con error estándar, $n > 12$ muestras independientes por duplicado por grupo. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Concluyendo que ninguno de los tratamientos no modificó la expresión del gen constitutivo empleado. Abreviaturas: Bic: Bicalutamida, I₂: Yodo molecular.