



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

**"EFECTOS DEL YODO EN LA VIABILIDAD CELULAR Y  
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS, EN LÍNEAS CELULARES DE  
CÁNCER DE PRÓSTATA: INFLUENCIA DEL ESTADO ESTEROIDOGÉNICO"**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**MARÍA DE LOURDES ÁLVAREZ CÁRDENAS**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DRA.ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA.EDITH ARNOLD HERNANDEZ  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**DRA.YOLANDA CRUZ GOMEZ  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE TLAXCALA**

**Querétaro, Qro. Noviembre 2023**



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.

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: *María de Lourdes Álvarez Cárdenas*, cuyo título es: “Efectos del yodo en la viabilidad celular y producción de citocinas, en líneas celulares de cáncer de próstata: Influencia del estado esteroideogénico” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente: Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández

Secretario: Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Vocal: Dra. Rebeca Corona García-Cabral

Suplente: Dra. Yolanda Cruz Gómez

Suplente: Dr. José Ávila Mendoza

El presente trabajo de maestría se realizó bajo la tutoría y coordinación de la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano en el laboratorio de Metabolismo Energético (laboratorio D-02) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, Querétaro. El proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IN217223, IN205920, , IN202322) de la UNAM. María de Lourdes Álvarez recibió una beca 1083072 otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (CONAHCYT).

## **Agradecimientos académicos**

A la Coordinación de Posgrado, en especial a la Dra. Nuri Aranda López por la disposición presentada en todo momento para llevar a cabo todos los trámites administrativos durante la maestría en ciencias (neurobiología) realizados en el Instituto de Neurobiología.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (Becario No. 1083072) por el apoyo con la beca para el estudio de este posgrado.

A la Dra. Evangelina Delgado González, a la M. en C. Adriana González Gallardo, al M. en C. Carlos Montes de Oca y al M. en C. Andy Brian Hernández Abrego por su asesoramiento en el uso de los equipos, así como, su valioso apoyo técnico y/o teórico.

A mi comité tutor conformado por las Dras. Edith Arnold Hernández y Yolanda Cruz Gómez por orientarme y nutrir con sus valiosas aportaciones a este proyecto.

A la Dra. Carmen Aceves por recibirme siempre con la mejor disposición e integrarme siempre de la mejor manera a su valioso grupo de trabajo.

En especial a la Dra. Brenda Anguiano Serrano primeramente por su confianza, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por toda su atención y paciencia para contribuir de la mejor manera a mi formación. Agradezco sus valiosos consejos y dedicación hacía mi persona, así como, las numerosas platicas en las que me animaba y reafirmaba la confianza académica hacia mi persona. Muchas Gracias Dra.

## **Agradecimientos personales**

A Dios por proveerme de sabiduría y paciencia, por hacerme ver que soy más capaz de lo que yo pensaba permitiéndome llevar a cabo este trabajo para así concluir con mis estudios de Maestría.

A mi familia, a Andy mi esposo quien me motivo e impulso en los momentos más difíciles, a mi hija Darianne por siempre brindarme fuerza y alegría. A ambos quienes fueron mi pilar y apoyo, por acompañarme en las noches de desvelo, por soportar mis días largos de tareas y trabajo.

A mis padres Tomas y Tatiana por su apoyo incondicional para poder concluir con cada meta por siempre impulsarme a no abandonar mis sueños.

A mis hermanos, José y Lupita por ayudarme en cada momento que los necesitaba, por darme palabras de aliento en los momentos difíciles

A las buenas amistades que se dieron del laboratorio en el que trabajé (D-02) así como los amigos y gran equipo que surgieron de la Maestría en ciencias en Neurobiología ya que fueron de gran importancia para nutrir mi conocimiento.



# Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Próstata .....	3
2.2 Tipos celulares en la próstata .....	4
2.3 Efectos biológicos de los andrógenos en la próstata .....	5
2.3.1. Receptor de andrógenos .....	6
2.4 Efectos biológicos de los estrógenos en la próstata.....	6
2.4.1 Receptores de estrógenos .....	8
2.5 Cáncer de próstata .....	9
2.5.1 Efecto de los esteroides en la inflamación crónica y el cáncer prostático.....	10
2.5.2 Efecto de los esteroides en la proliferación y la capacidad invasiva en líneas celulares de cáncer prostático.....	10
2.5.3 Efectos de TNF- $\alpha$ en líneas celulares de cáncer de próstata .....	11
2.6 Fisiología del Yodo .....	12
2.6.1 Efectos antineoplásicos del yodo en distintos modelos de cáncer .....	12
2.6.2 Efectos del yodo en modelos de próstata .....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVO GENERAL.....	15
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL .....	16
6.1 Reactivos .....	16
6.2 Líneas celulares .....	16
6.3 Diseño experimental.....	17
6.4 Técnicas y métodos analíticos. ....	19
Viabilidad celular. ....	19
Ensayo de incorporación de BrdU .....	19
Extracción de RNA.....	19
Ensayo de ELISA para cuantificar la secreción de IL6.....	20
6.5 Análisis Estadístico.....	21
7. RESULTADOS .....	23

7.1 Efecto dosis respuesta de E <sub>2</sub> , T y/o I <sub>2</sub> en la viabilidad de las células DU145. ....	23
7.2 Efectos de E <sub>2</sub> , T y I <sub>2</sub> en la expresión de TNF- $\alpha$ y la secreción de IL6 en células DU145. ....	23
7.3 Efectos del E <sub>2</sub> , y/o T en presencia o ausencia de I <sub>2</sub> en la expresión de ER $\beta$ , Nkx31 y PPAR $\gamma$ en las células DU145.....	25
7.4 Efectos del I <sub>2</sub> y/o TNF- $\alpha$ en la viabilidad, la proliferación celular, la secreción de IL6 y la capacidad invasiva en las células representativas de cáncer prostático.....	27
8. DISCUSIÓN .....	30
9. Conclusiones .....	34
10. REFERENCIAS .....	34
11. ANEXO.....	47



## Índice de figuras

FIGURA 1. ANATOMÍA Y REPRESENTACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES DE LA PRÓSTATA .....	4
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA TESTOSTERONA Y LA DIHIDROTESTOSTERONA (DHT) .....	5
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ESTRÓGENOS .....	7
FIGURA 4. VÍA CLÁSICA DE SEÑALIZACIÓN DE ESTEROIDES .....	8
FIGURA 5. EFECTOS DEL E <sub>2</sub> Y/O I <sub>2</sub> EN LA VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA DU145.....	23
FIGURA 6. EFECTOS DEL I <sub>2</sub> Y DE LA INTERACCIÓN I <sub>2</sub> -ESTEROIDES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y SECRECIÓN DE IL6 EN LA LÍNEA DU145.....	24
FIGURA 7. EFECTOS DEL I <sub>2</sub> Y DE LA INTERACCIÓN I <sub>2</sub> -ESTEROIDES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES EN LA LÍNEA DU145.....	26
FIGURA 8. EFECTOS DE TNF- $\alpha$ Y/O I <sub>2</sub> EN DIVERSOS PROCESOS CELULARES EN LA LÍNEA DU145.....	<b>28</b>
FIGURA 9. EFECTOS DEL I <sub>2</sub> EN LA CAPACIDAD DE INVASIÓN DE LAS CÉLULAS LNCAP Y PC3.....	29
FIGURA 10. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ E IL6.....	50

## Índice de Tablas

TABLA I. LOCALIZACIÓN Y SEÑALIZACIÓN DE RECEPTORES DE MEMBRANA. ....	9
TABLA II. FACTORES DE RIESGO EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA. ....	9
TABLA III. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA REACCIÓN DE PCR .....	22

## Anexo

FIGURA 1. MUESTRAS Y AMPLIFICACIÓN DE RNA OBTENIDO DE LA LÍNEA CELULAR DU145.....	48
FIGURA 2. EXPRESIÓN DE LOS <i>ERs</i> EN LAS CÉLULAS DU145.....	49
FIGURA 3. EXPRESIÓN DEL AR EN LAS CÉLULAS LNCAP Y DU145.....	49

## Índice de abreviaturas

<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrógenos $\alpha$
<b>ER<math>\beta</math></b>	Receptor de estrógenos $\beta$
<b>AR</b>	Receptor de andrógenos
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>T</b>	Testosterona
<b>DHT</b>	Dihidrotestosterona
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta a andrógenos
<b>GPRC6A</b>	Receptor acoplado a proteína G de clase C
<b>ERE</b>	Elemento de respuesta a estrógenos
<b>RC</b>	Receptores de Glucocorticoides
<b>GPER</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor Nuclear de kapa B
<b>IL6</b>	Interleucina 6
<b>I<sub>2</sub></b>	Yodo molecular
<b>CaP</b>	Cáncer de próstata
<b>NKX3-1</b>	Gen supresor de tumores prostáticos
<b>DU145</b>	Línea celular de cáncer de próstata no responsiva a andrógenos
<b>LNCaP</b>	Línea celular de cáncer de próstata responsiva a andrógenos
<b>PC3</b>	Línea celular de cáncer de próstata no responsivas a andrógenos

## RESUMEN

En el laboratorio de metabolismo energético del Instituto de Neurobiología de la UNAM se estudian los efectos del yodo molecular ( $I_2$ ) en la fisiopatología de diversos órganos y tejidos. En líneas celulares de cáncer prostático, el  $I_2$  induce la pérdida de la viabilidad celular y potencia el efecto anti-proliferativo de los anti-andrógenos. *In vivo*, el  $I_2$  previene la inflamación de la próstata inducida por estradiol ( $E_2$ ), pero los efectos directos del  $I_2$  y/o estrógenos o citocinas, no han sido estudiados en modelos de cáncer prostático. El objetivo de la presente tesis fue analizar los efectos de la combinación  $I_2$ - $E_2$  o  $I_2$ -TNF- $\alpha$ , en la viabilidad y proliferación celular, capacidad invasiva y secreción de interleucina (IL6) en la línea celular DU145. Se realizaron estudios dosis respuesta de  $E_2$  (0.1, 1, 10 y 100 nM) y TNF- $\alpha$  (0.1, 1, 10 y 50 ng/ml) sobre la viabilidad (azul tripano) y proliferación celular (incorporación de BrdU). Subsecuentemente se analizaron los efectos de 400  $\mu$ M  $I_2$  ( $IC_{50}$  previamente reportado) en presencia o ausencia de 10 nM  $E_2$  o de 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  en la viabilidad celular, secreción de IL6 (IL6) (ELISA) y/o capacidad invasiva (*Transwell*). Los datos se analizaron con ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los resultados mostraron que 10 nM de  $E_2$  aumentó la proliferación celular y el co-tratamiento con  $E_2+I_2$  previno dicho aumento. Los tratamientos individuales con  $E_2$  o  $I_2$  disminuyeron la expresión y secreción de IL6, pero estos efectos no se potenciaron por la combinación  $E_2+I_2$ . Por otra parte, TNF- $\alpha$  disminuyó la proliferación celular y capacidad invasiva, pero aumentó la secreción de IL6. El  $I_2$  redujo la capacidad invasiva y previno la secreción de IL6 inducida por TNF- $\alpha$ . El efecto anti-invasivo del  $I_2$  también se extendió a otras líneas celulares de cáncer prostático dependientes (LNCaP) e independientes de andrógenos (PC3). Los resultados mostraron la sensibilidad de las células DU145 a las acciones anti-proliferativas, anti-invasivas y potencialmente anti-inflamatorias del  $I_2$ , los cuales se mantienen ante una estimulación con  $E_2$  o TNF- $\alpha$ . Los mecanismos detrás de estas acciones deben ser estudiados y extendidos a otras líneas celulares y modelos *in vivo* de cáncer prostático.

## **ABSTRACT**

The effects of molecular iodine ( $I_2$ ) on the pathophysiology of various organs and tissues are being studied in the energy metabolism laboratory of the Institute of Neurobiology of the UNAM. In prostate cancer cell lines,  $I_2$  induces the loss of cell viability and potentiates the anti-proliferative effect of anti-androgens. *In vivo*,  $I_2$  prevents estradiol ( $E_2$ )-induced prostate inflammation, but the direct effects of  $I_2$  and/or estrogens or cytokines have not been studied in prostate cancer models. The aim of the present thesis was to analyze the effects of  $I_2$ - $E_2$  or  $I_2$ -TNF- $\alpha$  combination on cell viability and proliferation, invasive capacity and Interleukin 6 (IL6) secretion in the DU145 cell line. Dose response studies of  $E_2$  (0.1, 1, 1, 10 and 100 nM) and TNF- $\alpha$  (0.1, 1, 1, 10 and 50 ng/ml) on cell viability (trypan blue) and proliferation (BrdU incorporation) were performed. Subsequently, the effects of 400  $\mu$ M  $I_2$  ( $IC_{50}$  previously reported) in presence or absence of 10 nM  $E_2$  or 10 ng/ml TNF- $\alpha$  on cell viability, secretion IL6 (ELISA) and/or invasiveness (Transwell) were analyzed. Data were analyzed with one-way ANOVA and Tukey's post hoc test ( $p < 0.05$ ). Results showed that 10 nM with  $E_2$  increased cell proliferation and  $E_2+I_2$  co-treatment prevented such increase. Individual treatments with  $E_2$  or  $I_2$  decreased IL6 expression and secretion, but these effects were not enhanced by the  $E_2+I_2$  combination. On the other hand, TNF- $\alpha$  decreased cell proliferation and invasiveness, but increased IL6 secretion.  $I_2$  reduced invasive capacity and prevented TNF- $\alpha$  -induced IL6 secretion. The anti-invasive effect of  $I_2$  also extends to androgen-dependent (LNCaP) and androgen-independent (PC3) prostate cancer cell lines. The results show the sensitivity of DU145 cells to the anti-proliferative, anti-invasive and potentially anti-inflammatory actions of  $I_2$ , which are maintained upon challenge with  $E_2$  or TNF- $\alpha$ . The mechanisms behind these interactions need to be studied and extended to other cell lines and *in vivo* models of prostate cancer.

## 1. INTRODUCCIÓN

La inflamación crónica de origen infeccioso o no infeccioso es una condición que favorece el desarrollo y progresión de patologías prostáticas, como la hiperplasia y el cáncer. Los factores de riesgo relacionados con la condición no infecciosa son el envejecimiento, la obesidad, el síndrome metabólico, la exposición a xenobióticos y el sedentarismo (Hughes et al., 2005; Bandini et al., 2017; Krušlin et al., 2017). Algunas de estas condiciones conllevan a desregulaciones hormonales, además se conoce que la deficiencia de andrógenos y/o niveles aumentados de estrógenos están relacionados con la inflamación de la próstata (Vignozzi et al., 2016).

En la próstata, los receptores nucleares de andrógenos (AR) y los receptores a estrógenos beta (ER $\beta$ ) regulan la diferenciación celular epitelial y median acciones antiinflamatorias (Di Croce et al., 1999), mientras que los receptores a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) se expresan primordialmente en el estroma y median acciones proliferativas e inflamatorias (Di Zazzo et al., 2018). El aumento en la proporción E<sub>2</sub> /andrógenos induce la adquisición de un microambiente inflamatorio en la próstata normal, pero la relevancia de esta proporción no está bien entendida en el cáncer. Estudios *in vitro* muestran que concentraciones fisiológicas de E<sub>2</sub> aumentan la proliferación celular en líneas dependientes de andrógenos (LNCaP) (Arnold et al., 2005), pero no en las independientes de andrógenos (DU145, PC3) (Lafont et al., 2020). Contrario a lo esperado, los receptores ER $\beta$  están sobre-expresados en la próstata tumoral y la presencia de las variantes ER $\beta$ 2 y ER $\beta$ 5 se correlaciona con la malignidad del tumor y además representa un pobre pronóstico en la esperanza de vida del paciente (Christoforou et al., 2014). Por otro lado, se conoce que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) promueve la proliferación celular y favorecer un ambiente inflamatorio en células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos, sin embargo la señalización de este factor también puede conducir a la apoptosis así como a la progresión del tumor (por inducción de citoquinas y genes de supervivencia) mediante la activación de diferentes vías de transducción ya sea a través de la señalización de TNF-R1/caspasa 8 y/o TNF-R2/NFKB (Blasko et al 1997; Maolake et al 2017; Wang et al 2009).

Por otra parte, el yodo ( $I_2$ ) es un micronutriente del grupo de los halógenos que de manera directa o indirecta interviene en procesos antioxidantes, apoptóticos e inmunomoduladores en diversos tipos de epitelios o tejidos cancerosos (Aceves et al., 2021). La próstata murina normal y cancerosa expresa los mecanismos relacionados con la captura de  $I_2$  (Olvera-Caltzontzin et al., 2013) y se conoce que el aporte de  $I_2$  atenúa el estrés oxidativo e inflamación inducida por un exceso de testosterona o estrógenos, respectivamente (Quintero et al., 2018, Anguiano et al., 2023). El  $I_2$  reduce la viabilidad celular en varias líneas de cáncer de próstata, pero sus efectos en la expresión o interacción con citoquinas no han sido descritos. Así, el propósito de esta tesis fue analizar los efectos del  $I_2$  en la viabilidad y expresión de citocinas, en la línea DU145 ( $AR^-$ ,  $ER\beta^+$ ) cultivada en ausencia o presencia de  $E_2$  o de  $TNF-\alpha$ , así como evaluar los efectos del  $I_2$  y  $TNF-\alpha$  en el potencial invasivo. Para poner en contexto el trabajo, en esta tesis se revisan aspectos generales sobre los efectos de las hormonas sexuales en la fisiología de la próstata y cómo la desregulación de estas hormonas representa un factor de riesgo o progresión de inflamación y del cáncer. Se revisan aspectos básicos de la fisiología del  $I_2$  y su implicación en el cáncer, para dar lugar al planteamiento y objetivos de la tesis. Se presentan y discuten los resultados y se finaliza con las conclusiones del estudio.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Próstata**

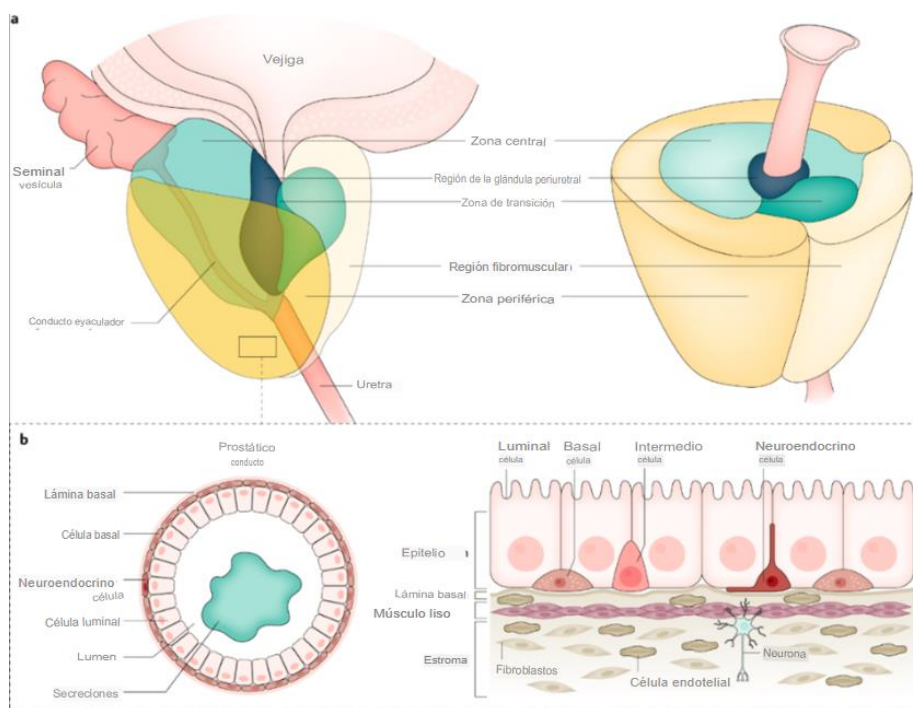
La próstata es una glándula del sistema genitourinario que se encuentra presente en la mayoría de los mamíferos machos (Frick & Aulitzky 1991). El crecimiento y desarrollo de esta glándula comienzan en la vida fetal y terminan en la etapa de madurez sexual (Marker, 2003). La próstata contribuye a la producción del fluido seminal y al éxito reproductivo, ya que los productos de secreción de esta glándula son relevantes para el funcionamiento de los espermatozoides y, por ende, para la fertilidad masculina. Como glándula endocrina, contribuye a la conversión rápida de la testosterona a un andrógeno más potente, la dihidrotestosterona (DHT) y, por lo tanto, también influye, de manera indirecta, en las funciones hipotalámicas e hipofisarias a través de una regulación negativa ejerciendo efectos inhibidores sobre la secreción de la FSH y la LH (Kumar & Majumder 1995).

La próstata tiene una estructura túbulo alveolar cuya unidad funcional la conforma el acino y el árbol ductal. La próstata humana, con base con algunos referentes anatómicos, se divide en zonas (periférica, central y de transición) y regiones (fibro-musculares y peri-uretral) (Figura 1a). En hombres adultos jóvenes, la zona periférica constituye más del 70% del tejido glandular y contribuye con la mayor producción de fluido prostático. También es el sitio en el que más frecuentemente se originan las neoplasias, ya que casi el 80% de los tumores de próstata surgen en esta zona (McNeal, 1981; Timms, 2008; Zlotta et al., 2013) (Figura 1). La zona central representa el 20% del tejido glandular y es atravesada por los conductos eyaculadores, mientras que la zona de transición representa del 5 al 10 % del tejido glandular y es atravesada por la uretra. La región fibro-muscular está conformada por musculatura lisa y tejido conectivo (McNeal, 1981; Mcneal et al., 1997; Timms, 2008). La proliferación del estroma fibro-muscular y el remodelamiento de la matriz (compuesta por glicosaminoglicanos), son parte de los procesos que ocurren durante el desarrollo de la hiperplasia prostática benigna (BPH) (Babinski et al., 2002). A nivel celular, los acinos están conformados por una monocapa de epitelio secretor, la cual está rodeada de células basales, neuroendócrinas y una compleja red de proteínas de matriz extracelular Figura 1.



## 2.2 Tipos celulares en la próstata

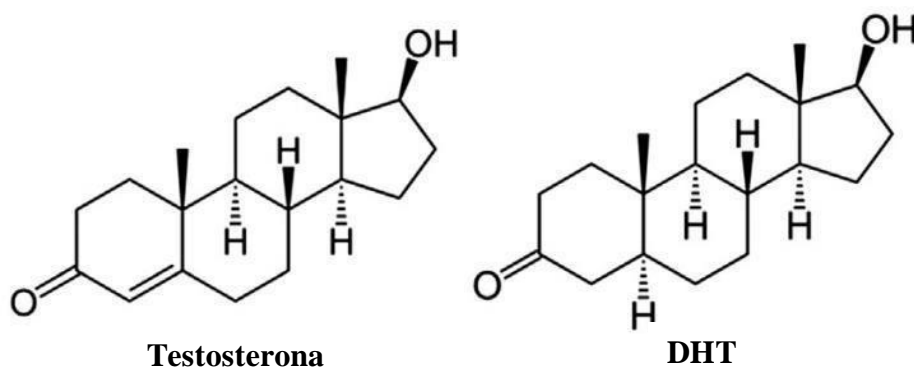
El acino contiene células epiteliales que componen el tejido glandular (Figura 1b). Dentro del epitelio prostático, se han identificado células de tipo luminal, basal, intermedio y neuroendocrino (NE) (Rybak et al., 2015). La función secretora de las células luminales depende de andrógenos y de la expresión de múltiples genes dependientes de la señalización de andrógenos. Las células basales se encuentran intercaladas entre las células luminales y la membrana basal, presentan un alto potencial de proliferación, expresan bajos niveles del receptor de andrógenos (AR) y su sobrevivencia no depende de andrógenos. Las células con un fenotipo intermedio presentan un alto potencial de proliferación y expresan niveles bajos de AR. Por otra parte, las células NE se encuentran dispersas entre las células basales y luminales, tienen una función secretora, producen neuropéptidos (el neuropéptido Y, la cromogranina A y calcitonina) y no expresan el AR (Rybak et al., 2015; Butler, & Huang, 2021)) (Figura 1b).



**Figura 1:** Anatomía y representación de los distintos tipos celulares de la próstata. a) Divisiones de la próstata: la zona central, la zona de transición y la zona periférica. b) Microestructura y composición celular del epitelio glandular de la próstata. Imágenes tomadas de: Verze et al., 2016.

### 2.3 Efectos biológicos de los andrógenos en la próstata

La próstata es una glándula cuya función, crecimiento y patología depende de andrógenos, los cuales están representados por la testosterona (T) y la dihidrotestosterona (DHT). Estas moléculas se sintetizan a partir del colesterol, forman parte del grupo de los esteroides y pertenecen a la clase de los androstanos. Su estructura química contiene 19 átomos de carbono (C), un átomo de oxígeno en el C3 y un radical hidroxilo en el C17 (Figura 2). Los andrógenos son los responsables del desarrollo fenotípico masculino durante la embriogénesis y durante la maduración sexual en la pubertad (Heemers et al., 2007). El 90 % de la T 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 T, la DHT presenta una afinidad dos o tres veces mayor por el AR (Grino et al., 1990). En la próstata la T puede ser convertida por acción de la  $5\alpha$ -reductasa a DHT, y por acción de la aromatasa, a  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) (Tan et al., 2015; Dai et al., 2017). Ambos tipos de andrógenos actúan a través de los AR los cuales dirigen el desarrollo prostático (Duran et al., 2011; Chan y Dehm, 2014).



**Figura 2.** Estructura de la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) (Ogino et al., 2016).

La próstata se origina del endodermo y se desarrolla a partir del seno urogenital, como producto de la interacción entre las células mesenquimales y las células epiteliales. Las células mesenquimales poseen AR y su activación es determinante en la producción de factores de diferenciación los cuales dirigen la morfogénesis de la próstata (Wen et al., 2015). Los AR se expresan primordialmente en el estroma y, a través de su señalización, mantienen

la integridad y función de la próstata regulando la tasa de proliferación y muerte celular, así como la actividad secretora de la glándula (Mirrone et al., 2006).

### *2.3.1. Receptor de andrógenos*

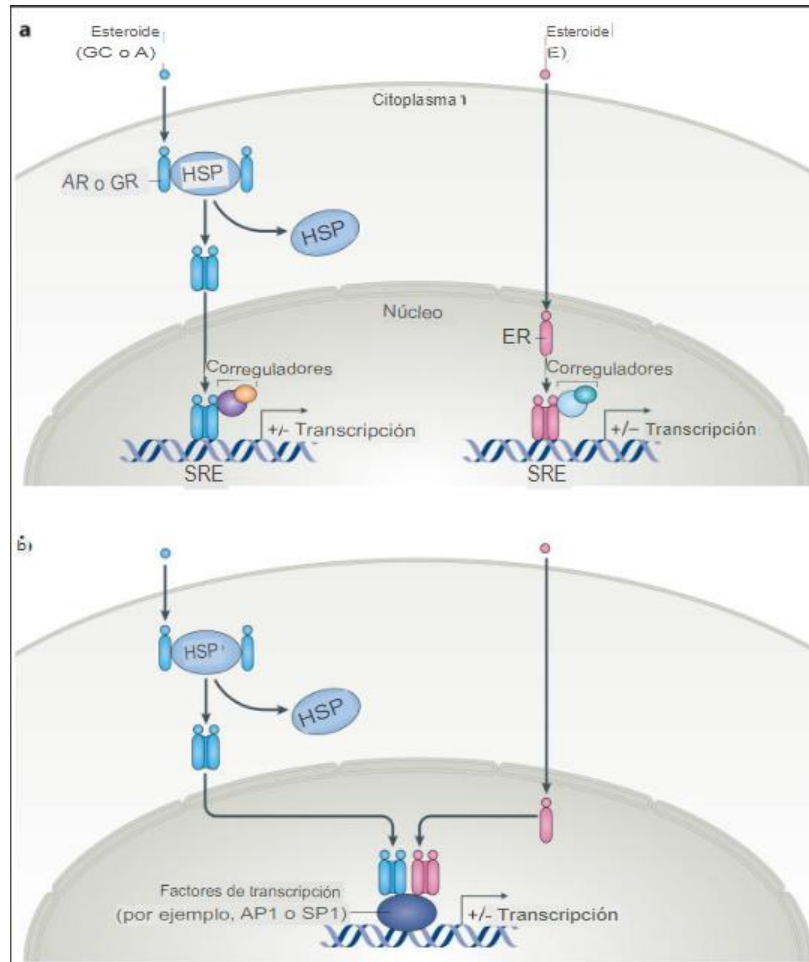
El AR es miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción regulados por ligando (Tan et al., 2015). Los efectos de los andrógenos han sido explicados a través de activar una vía canónica que involucra la activación de receptores nucleares y su unión al ADN, pero también a través de mecanismos no canónicos, los cuales no involucran una interacción directa del receptor con el ADN, pero sí la activación de las vías de MAPK y AKT o bien a través de mediar acciones membranales (Figura 3) (Leung & Sadar, 2017).

La unión de los andrógenos con el AR induce cambios conformacionales provocando que el receptor se transloque al núcleo por medio de la proteína importina  $\alpha$ . En el núcleo, los receptores forman homodímeros, los cuales se unen a los elementos de respuesta de andrógenos (ARE) en las regiones promotoras de los genes blanco. Posteriormente se reclutan proteínas correguladoras para facilitar o inhibir la transcripción (Tan et al., 2015; Davey y Grossmann, 2016). La evidencia reciente sugiere que, los andrógenos también pueden unirse y activar un receptor alternativo en la membrana plasmática como lo es el miembro A del grupo 6 de la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR6A), el cual señala a través de la vía de ERKs (Levin & Hammes, 2016).

## **2.4 Efectos biológicos de los estrógenos en la próstata**

Como todos los esteroides, los estrógenos también se producen a partir del colesterol. Los estrógenos están representados principalmente por el  $17\beta$  estradiol ( $E_2$ ), la estrona ( $E_1$ ) y el estriol ( $E_3$ ) (Figura 4), siendo el  $E_2$  el más potente, pues presenta una afinidad de 10 a 80 veces mayor por los receptores a estrógenos (ER) (Houtman, Legler, & Thomas, 2011). El  $E_2$  contribuye al desarrollo de la próstata, promoviendo o limitando su crecimiento, dependiendo de la etapa de desarrollo y tipo de receptor expresado (Rahman et al., 2016; Di Zazzo et al., 2018). Es frecuente que en hombres mayores de 50 años ocurra un aumento del volumen prostático y, aunque los factores son múltiples y no del todo bien entendidos, se

conoce que la andropausia (aumento en la proporción  $E_2/T$ ), podría ser parte de los factores relacionados con el crecimiento prostático (Ramírez et al., 2015).

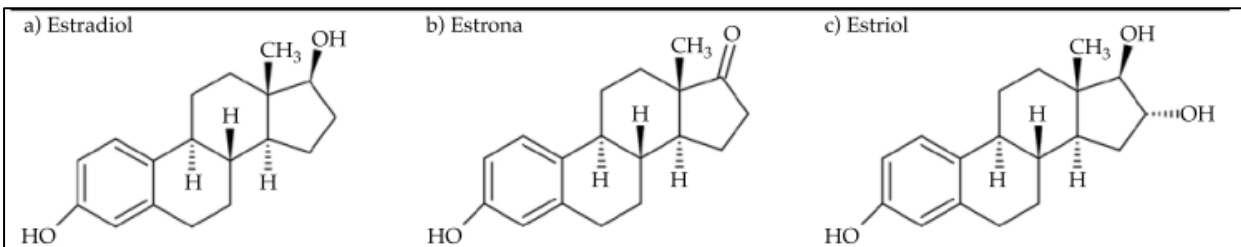


**Figura 3.** Vía clásica de señalización de esteroides. Algunos receptores de esteroides, como los receptores de glucocorticoides (GC) y andrógenos (A) (GR y AR, respectivamente), (azul), se encuentran principalmente en el citoplasma como monómeros unidos a proteínas de choque térmico (HSP). Otros, como el receptor de estrógeno (E) (RE) (rosa), se ubican como monómeros principalmente en el núcleo (a). La unión de los esteroides a los receptores citoplasmáticos desencadena la liberación de las HSP, la dimerización del receptor modifica la conformación del receptor y promueve su translocación al núcleo. En el caso de E, el esteroide sexual se une a receptores nucleares para promover la dimerización y cambios en la conformación del receptor. En todos los casos, los receptores nucleares dimerizados luego se unen a elementos de respuesta a esteroides específicos (SRE) e interactúan con varios corre reguladores para modular la transcripción genética mediante represión o activación. Los

complejos hormona receptor también pueden modular la expresión génica a través de interactuar con otros factores de transcripción (AP1, SP1) y no de manera directa con el promotor de genes blanco (b) (modificadas de Levin & Hammes, 2016).

#### 2.4.1 Receptores de estrógenos

Los ER pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, actúan como factores de transcripción modulados por ligando y se reconocen dos tipos: ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Di Croce et al., 1999). Estos receptores actúan principalmente a través del mecanismo nuclear canónico y un mecanismo extra nuclear, no genómico. En el mecanismo canónico, los estrógenos se internalizan y se unen a su receptor citoplasmático el cual entra al núcleo y forma un dímero (Figura 4). El complejo hormona-receptor se une en la región promotora de los genes blanco, en secuencias que contienen elementos de respuesta a estrógeno (ERE) (Di Zazzo et al., 2018). Existe evidencia que los mecanismos no canónicos de los ERs, involucran su interacción en la membrana con caveolina 1, lo cual induce la activación de señales rápidas en segundos. Esto incluye la generación de nucleótidos cíclicos como el cAMP y cGMP y aumento del flujo de calcio. Por otra parte, el E<sub>2</sub> también actúa a través de un receptor acoplado a proteína G (GPER), el cual señala aumentando la concentración de cAMP y activando cinasas (Tabla I) (Levin & Hammes, 2016). La activación de GPR30 regula la proliferación, migración celular y apoptosis en la próstata. También estimula la actividad de la aromatasa y favorece la producción local de más estrógeno (regulación positiva) (Lau et al., 2017; Xu et al., 2019).



**Figura 4.** Estructura química de los estrógenos: Imagen modificada de Ramírez et al., 2015.

**Tabla I.** Localización y señalización de receptores de E<sub>2</sub> de membrana

Receptor	Isoformas	Señales río abajo
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	66 kDa, 46 kDa y 36 kDa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activación de proteína G: flujo de calcio, producción de nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP)</li> <li>• Activación de cinasas (AKT, Src y PI3K)</li> </ul>
<b>ER-<math>\beta</math></b>	57kDa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activación de proteína G: flujo de calcio, cAMP y cGMP</li> <li>• Activación de cinasas (cinasa C)</li> </ul>
<b>GPER ó GPR30</b>	132 kDa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activación de proteína G: cAMP</li> <li>• Activación de cinasas (ERK)</li> </ul>

Modificado de Levin., 2016

## 2.5 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es una de las neoplasias más comúnmente diagnosticadas y representa la sexta causa de muerte por cáncer en todo el mundo (Leslie et al., 2022). Es de origen epitelial y dependiendo del subtipo, presenta características histopatológicas y moleculares heterogéneas. La mayoría de los diagnósticos de cáncer de próstata se realizan en hombres sintomáticos mayores a 50 años, los cuales presentan síntomas del tracto urinario inferior (Merriell et al., 2018; Rosen et al., 2003). Sin embargo, se sospecha que hay un número significativo de hombres que mueren por cáncer de próstata que no fueron diagnosticados (Merriell et al., 2018; Kannan et al., 2019). En la tabla II se muestran algunos de los principales factores de riesgo identificados en el desarrollo de este cáncer (Tabla II).

**Tabla II.** Factores de riesgo en el cáncer de próstata. Tomada de Bernardo et al., 2014.

Factor de riesgo	Consideración
Edad	Mayores de 55 y su punto máximo entre los 70 y los 74 años.
Historia familiar	Aumenta el riesgo si el padre o hermano tuvo la enfermedad y en menor grado sí la madres o hermana ha tenido cáncer de mama.

Etnicidad	Mayor riesgo entre los hombres afroamericanos en comparación con los hombres blancos, asiáticos e indio americanos.
Cambios en la próstata por alteraciones genéticas	Células anormales descritas como neoplasia intraepitelial prostática de alto grado

### 2.5.1 Efecto de los esteroides en la inflamación crónica y el cáncer prostático

Está bien establecido que los esteroides pueden contribuir a la progresión de cáncer prostático, (Carruba, 2007; Di Zazzo et al., 2018). En modelos murinos la exposición por largo plazo con dosis altas de E<sub>2</sub>+T causa lesiones premalignas como la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y adenocarcinoma (Ellem & Risbridger, 2007). Se ha sugerido que los niveles altos de E<sub>2</sub> y niveles bajos de T pueden inducir eventos inflamatorios y la aparición de lesiones premalignas (Ellem y Risbridger, 2010; Gueron et al., 2013). La inflamación crónica asociada al microambiente tumoral impacta en el desarrollo y progresión del cáncer prostático (Kanda et al., 2017). Las células inmunes activan procesos anti-tumorogénicos y, a su vez, las células cancerosas producen un conjunto de citocinas y quimiocinas que culminan en la progresión de los tumores a través de acciones proliferativas y angiogénicas, así como producción de especies reactivas de oxígeno (Smyth et al., 2004). Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el cambio en la relación E<sub>2</sub>/T en el cáncer. En el caso del cáncer prostático, la aromatasa se sobreexpresa y aumenta la producción *in situ* de E<sub>2</sub> (Grindstad et al., 2016). Los E<sub>2</sub> modulan diferencialmente la progresión del cáncer a través de los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  al estimular o inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias (Lafront et al., 2020). La activación del ER $\beta$  reduce la inflamación y suprime la activación de la vía NF- $\kappa$ B, y s la expresión TNF- $\alpha$  y la secreción basal o regulada de interleucina 6 (IL6) en líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y PC3 (Inokuchi et al., 2009; Xiao et al., 2019).

### 2.5.2 Efecto de los esteroides en la proliferación y la capacidad invasiva en líneas celulares de cáncer prostático

La regulación esteroideogénica en la próstata es compleja. Se sabe que la T puede aromatizarse a E<sub>2</sub> o reducirse a DHT y esta última hormona puede transformarse en 5 $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol (3 $\beta$ -DIOL). E<sub>2</sub> promueve la inflamación y la proliferación activando el receptor de estrógeno nuclear alfa (ESR1), mientras que E<sub>2</sub> y 3 $\beta$ -ADIOL mantienen la diferenciación celular y contrarrestan la inflamación a través del receptor de estrógeno beta

(ESR2) (Ellem y Risbridger, 2010; Weihua et al., 2002). Existen estudios que muestran que la T, DHT y E<sub>2</sub> promueven la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de próstata dependientes (LNCaP) e independientes de andrógenos (DU145). Dosis fisiológicas de T estimulan la proliferación en las células LNCaP a través de la activación mediada por ligandos del AR, pero no en las PC3 o DU145 (Song & Khera 2014). Por otra parte, el E<sub>2</sub> aumenta la proliferación y capacidad invasiva en células LNCaP, DU145 y PC3 primordialmente por mecanismos no canónicos. Se ha descrito que el ER $\alpha$  no está implicado en promover la proliferación de células cancerígenas ya que, al utilizar un agonista específico de este receptor la proliferación de estas células (LNCaP, PC3 y DU145) no se ve modificada (Lafront et al., 2020). Los mecanismos proliferativos en las células LNCaP están mediados por la formación de un complejo ternario ER $\beta$ /AR/Src, el cual promueve la regulación positiva de la ciclina D1 y la progresión del ciclo celular (Migliaccio et al., 2000). En las células PC3, el E<sub>2</sub> estimula la síntesis de ADN y la activación de ciclina D2, a través del ER $\beta$ , pero el mecanismo no se entiende del todo bien (Lombardi et al., 2016). En otro estudio se mostró que el E<sub>2</sub> aumenta la capacidad invasiva de las células PC3 y DU145 cuando estas fueron tratadas con E<sub>2</sub> conjugado con albumina sérica bovina (no permea a la célula), sugiriendo una acción de los E<sub>2</sub> a nivel membrana (Gadkar et al., 2019).

### *2.5.3 Efectos de TNF- $\alpha$ en líneas celulares de cáncer de próstata*

TNF- $\alpha$  es una citocina multifuncional implicada en la apoptosis, la supervivencia celular, la inflamación y la inmunidad, que actúa primordialmente a través de los receptores de membrana TNFR1 y TNFR2 (Vandenabeele et al., 1995). Aunque la afinidad por el TNFR2 es cinco veces mayor que la del TNFR1, este último es más ubicuo y es el que inicia la mayor parte de los efectos biológicos de TNF- $\alpha$ . TNFR1 (p60) se expresa en todos los tipos de células, mientras que la expresión de TNFR2 (p80) se limita a las células inmunitarias. La principal diferencia entre los dos receptores es el dominio de muerte (DD), el cual está presente únicamente en TNFR1 (Van Horssen et al., 2006). En el microambiente tumoral, el TNF- $\alpha$  es producido por las células inmunes y por las células tumorales (Sanz et al., 2021). En las líneas celulares de cáncer prostático LNCaP y PC3, se ha reportado que TNF- $\alpha$  inhibe la proliferación celular de manera dosis respuesta (Wang et al., 2009) y el efecto anti-inflamatorio de TNF- $\alpha$  en la línea LNCaP, se ha explicado a través de una represión de la señalización del AR mediada por NF- $\kappa$ B (Maolake et al., 2018). En contraste, en células



DUI45 se ha observado que 20 ng/ml de TNF- $\alpha$  no afecta la viabilidad celular, pero puede aumentar la capacidad de migrar de estas células (Jayasooriya et al., 2012).

## 2.6 Fisiología del Yodo

El yodo es un micronutriente esencial para el desarrollo de los seres vivos. En la naturaleza se encuentra en diferentes formas químicas, como yoduro ( $I^-$ ), yodo molecular o diatómico ( $I_2$ ), triyoduro ( $I_3$ ), ácido hipoyodoso (HIO), y anión yodo ( $HI_2O^-$ ) (Gotardi 1999). En los vertebrados, el yodo es transportado e internalizado en la tiroides y glándula mamaria lactante para la síntesis de hormonas tiroideas y yodo-caseína de la leche (De la vieja & Santiestieban 2018) y puede también ser captado por tejidos no-tiroideos, halogenar al ácido araquidónico y dar lugar a la formación de yodolípidos. El  $I^-$  es internalizado a través del cotransportador  $Na^+/I^-$  (NIS), pendrina (PDS) y/o canales de cloro ( $Cl^-$ ) (Aceves et al., 2013), mientras que el  $I_2$  es internalizado en organismos como las algas y en tejidos como la glándula mamaria no lactante y la próstata, por un mecanismo de difusión facilitada que no depende de NIS (Aceves et al., 2013). Los efectos celulares del  $I_2$  han sido estudiados en tejidos como la glándula mamaria, neuroblastoma, páncreas y próstata, en diferentes condiciones fisiopatológicas (Aceves et al., 2021).

### 2.6.1 Efectos antineoplásicos del yodo en distintos modelos de cáncer

En un sistema libre de células se encontró que el  $I_2$  induce efectos directos antioxidantes tras reducir la oxidación de lípidos ya sea compitiendo con especies reactivas de oxígeno (ROS), o neutralizando los radicales (HO) (Alfaro et al., 2013) mientras que en líneas celulares de cáncer mamario y neuroblastoma se ha mostrado que el  $I_2$  disipa el potencial de membrana mitocondrial e induce apoptosis (Shrivastava et al., 2016; Mendieta et al., 2020). En modelos *in vivo* el aporte oral de  $I_2$  induce la generación de 6-yodolactona en la glándula mamaria normal y cancerosa, siendo la concentración de este yodolípido, 10 veces más alta en el cáncer (Aceves et al., 2009). Datos moleculares indican que la 6-yodolactona se produce a partir de la yodación del ácido araquidónico y que actúa como ligando de los receptores PPAR gamma ( $PPAR\gamma$ ), por lo que los efectos del  $I_2$  pueden ser explicados a través de la señalización de estos receptores (Nuñez-Anita et al., 2009; Nava-Villalba et al., 2015). En líneas celulares y/o modelos de xenotransplante de cáncer mamario, neuroblastoma y cérvix, se ha mostrado que el  $I_2$  induce arresto celular y/o efectos apoptóticos (vía BAX/BCL2) re-diferenciadores e

inmuno-moduladores, lo que se traduce en un menor crecimiento tumoral (Aceves et al., 2021). Estos efectos han llevado a explorar los efectos del I<sub>2</sub> en protocolos clínicos y se ha reportado que éste ejerce algunas acciones adyuvantes cuando se administra con quimioterapia (Moreno-Vega et al., 2019, Álvarez-León 2021).

### *2.6.2 Efectos del yodo en modelos de próstata*

En un modelo de hiperplasia prostática se encontró que el aporte de I<sub>2</sub> previene el estrés oxidativo inducido por una dosis alta de T, disminuyendo la tasa de lipoperoxidación, así como la actividad de las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS) y ciclooxigenasa 2 (Quintero et al., 2018). Por otra parte, en un modelo de inflamación prostática inducido por hiper-estrogenismo, se encontró que de manera conjunta la T y el I<sub>2</sub> regulan negativamente las señales proinflamatorias, disminuyendo el porcentaje de células positivas a TNF- $\alpha$  (Anguiano et al., 2023). A semejanza con lo observado en otros modelos de cáncer, el tratamiento con I<sub>2</sub> reduce la viabilidad e induce apoptosis en líneas de cáncer prostático dependientes (LNCaP) e independientes de andrógenos (DU145, PC3) (Aranda et al., 2013). En las células LNCaP, estos efectos del I<sub>2</sub> se potencian en presencia de antagonistas androgénicos como la bicalutamida y enzalutamida, sugiriendo acciones antiandrogénicas y anti-proliferativas (manuscrito en preparación 2023). Sin embargo, se desconoce si los efectos antiproliferativos del I<sub>2</sub> permanecerán bajo condiciones de hiperestrogenismo o bien bajo un ambiente proinflamatorio.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La inflamación crónica o prostatitis favorece el desarrollo y/o progresión de la hiperplasia prostática benigna y el cáncer prostático. El cáncer de próstata es la neoplasia más diagnosticada en hombres y la sexta causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Se ha sugerido que la andropausia y el consecuente aumento en la relación  $E_2/T$  y/o aumento en la conversión prostática de T a  $E_2$  son condiciones que conlleva a prostatitis y están presentes durante el envejecimiento, la obesidad, el síndrome metabólico, la exposición a disruptores endócrinos y/o las terapias anti-androgénicas. El  $I_2$  es un micronutriente que actúa como antioxidante y/o activador de la señalización de los receptores  $PPAR\gamma$ . En la próstata no cancerosa, el  $I_2$  media acciones antioxidantes y antiinflamatorias ante un exceso de T o estrógenos, respectivamente. En cáncer, el  $I_2$  promueve efectos anti-proliferativos sin embargo se desconoce si este efecto pudiera estar asociado a una menor producción de citocinas proinflamatorias en respuesta a estrógenos o bien bajo un estímulo proinflamatorio ( $TNF-\alpha$ ). En la presente tesis se estudiaron los efectos de la interacción  $I_2$ -estrógenos en la viabilidad celular, la expresión de citocinas y la capacidad invasiva en modelos *in vitro* de cáncer prostático.

### 4. HIPÓTESIS

- El yodo molecular contrarrestará la expresión de citocinas proinflamatorias y las acciones protumorales de TNF y potenciará las acciones antitumorales de  $E_2/ER\beta$  en un modelo *in vitro* de cáncer de próstata independiente de andrógenos.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Analizar en la línea celular de cáncer prostático DU145, los efectos del I<sub>2</sub> en la viabilidad, la proliferación celular y la expresión de citocinas proinflamatorias en presencia de E<sub>2</sub> o TNF- $\alpha$ , así como en la capacidad invasiva.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar los efectos de diferentes concentraciones de E<sub>2</sub> o TNF- $\alpha$  en la viabilidad de las células DU145.
- Evaluar los efectos individuales y combinados de la concentración IC<sub>50</sub> de I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> y/o TNF- $\alpha$  en la viabilidad y la proliferación celular en las células DU145.
- Evaluar los efectos individuales y combinados de la concentración IC<sub>50</sub> de I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, T y/o TNF- $\alpha$  en la expresión génica de citocinas y receptores nucleares en las células DU145.
- Evaluar los efectos individuales y combinados de la concentración IC<sub>50</sub> de I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> y/o TNF- $\alpha$  en la secreción de interleucina 6 al medio de cultivo.
- Evaluar los efectos del I<sub>2</sub> y/o TNF- $\alpha$  en la capacidad invasiva de las células DU145.
-

## 6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

### 6.1 Reactivos

El 17 $\beta$ -Estradiol (1,3,5[10]-Estratriene-3,17 $\beta$ -diol, E8875) y el propionato de testosterona (hormona aromatizable a E<sub>2</sub>) (17 $\beta$ -Hydroxy-4-androsten-3-one 17-propionate (16490079) fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich (San Luis Missouri, E.U.A.). La proteína recombinante humana TNF- $\alpha$  (ab206641) y el kit de BrdU (ab126556) se adquirieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). El medio DMEM (L0495), suero fetal bovino (SFB, S1620), suero fetal bovino tratado con carbón (SFB-CS, S181F) y penicilina/estreptomicina (L0018) para el cultivo celular fueron obtenidos de Biowest (Riverside, Reino Unido). El ensayo de ELISA de IL6 de humano (501030) se adquirió de los laboratorios Cayman (Ann Arbor, MI, E.U.A.). El trizol (15596026) y la enzima MMLV (10338842) fueron adquiridos de Invitrogen (Waltham, MA, E.U.A.). El oligo dT (SO131), los desoxirribonucleótidos (dNTPs, R0191), y los reactivos que acompañan a la Taq polimerasa (Sybergreen, K0222) se adquirieron de Thermo Scientific (Waltham, MA, E.U.A.). Las cámaras de invasión utilizadas (*Biocoat*) fueron de la marca Corning (354480, Corning NY, E.U.A.).

### 6.2 Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de próstata fueron obtenidas directamente de la ATCC (*American Type Culture Collection*). La línea DU145, LNCaP y PC3 son de origen epitelial humano y presentan un fenotipo adherente. La línea DU145 no responde a andrógenos, pero si responde a estrógenos (AR<sup>-</sup> ER<sup>+</sup>) y proviene de una metástasis de CaP a cerebro, mientras que la línea LNCaP responde a andrógenos (AR<sup>+</sup>) y fue aislada del ganglio linfático de un hombre con carcinoma de próstata metastásico. La línea PC3 no responde a andrógenos (AR<sup>-</sup>) y proviene de una metástasis a hueso. Las células DU145 y PC3 se cultivaron en medio DMEM y las LNCaP en medio RPMI en presencia de antibióticos. Los cultivos para los ensayos de TNF- $\alpha$  se suplementaron con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y los ensayos con esteroides se suplementaron 5% de FBS tratado con carbón activado (CSFBS) para depletar componentes no polares/lipofílicos (esteroides).

### 6.3 Diseño experimental

**Efecto dosis-respuesta del 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) en la viabilidad de las células DU145.** Se utilizaron placas de 12 pozos y se sembraron 15,000 células/pozo. Las células se trataron con 0.1, 1, 10 y 100 nM de E<sub>2</sub> cada 24 h durante 96 h. Se incluyó un grupo tratado con 10 nM de propionato de testosterona (T) con el propósito de evaluar la influencia que podría tener la conversión de T a E<sub>2</sub> en la viabilidad celular. El E<sub>2</sub> y la T se diluyeron en etanol y 0.1% de etanol fue utilizado como vehículo. La viabilidad se analizó mediante el ensayo de exclusión con azul tripano.

**Efectos del I<sub>2</sub> y/o esteroides en la viabilidad celular y la expresión génica en las células DU145.** Basados en los experimentos anteriores y manejando la misma cantidad de células para la siembra (15,000 células/pozo) se evaluaron los efectos individuales y combinados de 10 nM E<sub>2</sub> y 400  $\mu$ M I<sub>2</sub> o 10 nM T y 400  $\mu$ M I<sub>2</sub> en la viabilidad a las 96 h de tratamiento mediante el ensayo de exclusión con azul tripano. La concentración de I<sub>2</sub> utilizada equivale al valor de IC<sub>50</sub> reportado previamente (Aranda et al., 2013). Para el análisis de la expresión génica, 300,000 células/pozo fueron sembradas en placas de 6 pozos y tratadas durante 48 h. La expresión de *IL6*, *TNF- $\alpha$* , *ER $\alpha$* , *ER $\beta$* , *GPR30*, *AR* y *PPAR $\gamma$*  fue evaluada por PCR tiempo real. El gen *NKX3.1* codifica a un factor de transcripción regulado por andrógenos y se analizó como un indicador de la señalización androgénica. El método se describe en la siguiente sección.

**Efecto dosis respuesta de TNF- $\alpha$  en la viabilidad de las células DU145.** Las células se cultivaron en placas de 12 pozos (15,000 células/pozo). Se evaluaron los efectos sobre la viabilidad celular de 0.1, 1, 10 y 50 ng/ml de TNF-A a las 72 h de tratamiento mediante el ensayo de exclusión con azul tripano. Como vehículo, se utilizó BSA al 0.1 % en solución salina de fosfatos (PBS).

**Efectos del I<sub>2</sub> y/o TNF- $\alpha$  en la viabilidad y la proliferación de las células DU145.**

Para evaluar la viabilidad celular, las células se sembraron en placas de 12 pozos (30,000 células/pozo) y fueron tratadas de manera individual o combinada con 10 ng/ml TNF-A y/o

400  $\mu\text{M}$  de  $\text{I}_2$  durante 72 h y posteriormente analizadas por el método de azul tripano. La proliferación se analizó mediante el ensayo colorimétrico de bromodeoxiuridina (BrdU) que se describe posteriormente. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (10,000 /pozo) y tratadas con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  y/o 400  $\mu\text{M}$   $\text{I}_2$  por 48h. La incorporación de BrdU se analizó 6 h después de los tratamientos (Bio-Rad).

**Efecto del  $\text{I}_2$  en la expresión y la secreción de IL6 en las células DU145 estimuladas con TNF- $\alpha$ .** Las células se sembraron en placas de 6 pozos (300,000 células/pozo) y fueron tratadas con 400  $\mu\text{M}$   $\text{I}_2$  y/o 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  por 48h para analizar la expresión génica de IL6 y TNF- $\alpha$  mediante PCR tiempo real.

Para estudiar la secreción de IL6, las células fueron sembradas en placas de 12 pozos (30,000 células/pozo) y se llevaron a cabo los mismos tratamientos mencionados anteriormente, se midieron los niveles de IL6 en el medio de cultivo por ELISA. A las 72 h de tratamiento, se retiró el medio de cultivo, se ajustó el número a 50,000 células y las células se cultivaron por otras 6 h en un medio libre de tratamientos. Este paso fue necesario para evitar la interferencia directa del  $\text{I}_2$  con el cromóforo del ensayo de ELISA.

**Efecto del  $\text{I}_2$  en la capacidad invasiva de las células DU145, estimuladas con TNF- $\alpha$ .** Las células se sembraron en placas de 6 pozos (150,000 células/pozo) y fueron tratadas con 400  $\mu\text{M}$   $\text{I}_2$  y/o 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 72 h. La migración celular se analizó mediante un ensayo con cámaras tipo *Transwell* descrito posteriormente. Adicionalmente se analizó la capacidad invasiva de las líneas PC3 y LNCaP en presencia solo de  $\text{I}_2$  utilizando la concentración, cantidad de células y tiempo de tratamiento que se usaron para la DU145.

#### **6.4 Técnicas y métodos analíticos.**

**Viabilidad celular.** Posterior al tratamiento con tripsina, se recuperaron las células en medio de cultivo y se realizó una dilución 1/2 de la suspensión celular con 0,4% de azul tripano. Se aplicaron 10  $\mu$ l de esta preparación de células a la cámara de Neubauer, el número de células viables se cuantificó de manera manual en un microscopio de luz invertido. Este colorante tiñe las células muertas y es excluido por las células vivas. El número de células vivas se analizaron en función del tiempo.

**Ensayo de incorporación de BrdU.** La proliferación celular se analizó mediante el ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) al DNA (ab126556). Las células se incubaron con BrdU (1X) durante 6 h, se removió el medio y se adicionó medio de fijación por 30 min. Las células fijadas se incubaron con el detector el cual es un anticuerpo monoclonal primario anti BrdU (1 h) tiempo durante el cual se une a cualquier BrdU incorporado y el anticuerpo no unido se elimina por lavado, subsecuentemente se añade el anticuerpo, asociado a peroxidasa de rábano (anti-ratón IgG conjugado) (30 min) que se une al Detector de anticuerpos. La peroxidasa de rábano cataliza la conversión del sustrato cromógeno tetra-metilbencidina (TMB) a partir de una solución incolora a una solución azul (o amarilla después de la adición de reactivo de parada), la intensidad de la cual es proporcional a la cantidad de BrdU incorporada en las células. El producto de reacción coloreado (incorporación de BrdU) se mide a  $\lambda=450$  nm y se cuantifica usando un espectrofotómetro de microplaca (Bio-Rad).

**Extracción de RNA.** La extracción del RNA se realizó a partir de cultivos de DU-145 posterior a 48 horas de tratamiento se llevó a cabo utilizando de 400-500  $\mu$ l de Trizol por caja p60 o por pozo se agregó Cloroformo y después de centrifugar se recuperó la fase líquida y se desechó la fase orgánica (DNA) luego se agregó Isopropanol. se centrifugo se recuperó el pellet que contenía el RNA y finalmente se agregó etanol seguido de centrifugaciones para purificar y/o concentrar el RNA. La integridad del RNA se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para identificar las subunidades del RNA ribosomal, y la pureza se determinó mediante un análisis espectrofotométrico. La pureza del RNA se determinó mediante el cociente de absorción 260/280 nm cuyo valor debe estar entre 1.8 y 2, un cociente



menor a 1.8 sugiere contaminación con proteínas o compuestos orgánicos como el fenol. La retrotranscripción del RNA se llevó a cabo a partir de 2  $\mu\text{g}$  de RNA/muestra y 1  $\mu\text{L}$  de oligo dT, en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  en agua libre de nucleasas. La reacción se incubó a 65° C por 5 min y posteriormente se colocó en hielo por otros 5 min. Después se incubó con una mezcla de los desoxirribonucleótidos trifostato (dNTPs), los inhibidores de RNAsas, el dithiothréitol (DTT), y la enzima transcriptasa reversa M-MLV en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla se incubó por 1 h a 42°C y posteriormente a 55°C por 20 min para desnaturalizar la enzima. Mediante un gradiente de temperatura (95°C, 30 s; 60-62°C, 30 s; 72°C, 30 s) de 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%. Las reacciones de PCR tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene 300 (Corbett Research) en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  compuesto de: 1  $\mu\text{L}$  de DNAc, 0.4  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos (sentido y antisentido), 5  $\mu\text{L}$  de SyBR Green Qpcr Master MIX y 3.6  $\mu\text{L}$  de agua desionizada libre de DNAsas. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95° C (30 segundos), temperatura de alineamiento 55-62°C (30 segundos), y extensión de 72°C (30 segundos). En todos los experimentos la especificidad de los oligonucleótidos se confirmó mediante el análisis de la curva de disociación o “melt”, en la cual, la presencia de un solo pico confirmó la amplificación de un solo producto. Se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  para la cuantificación relativa del RNAm, teniendo como calibrador la expresión de  $\beta$ -actina (gen constitutivo) de cada muestra.

**Ensayo de ELISA para cuantificar la secreción de IL6.** En los sobrenadantes de los cultivos celulares se midieron los niveles de IL6 mediante un ensayo sándwich/ELISA para humano en una placa de 96 pozos. El sobrenadante (100  $\mu\text{l}$ ) se incubó con un anticuerpo primario conjugado a biotina por una hora y con streptavidina-acoplado a peroxidasa de rábano por 30 min seguida del sustrato adecuado proporcionado en el kit. El color producto de la reacción se analizó a 450 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad).

**Ensayo de invasión celular.** Se utilizó un sistema tipo Transwell el cual se conforma de una cámara interior compuesta de una membrana de PET/matrigel con un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$ . En el compartimento superior de la cámara se colocaron 25,000 células en 250  $\mu\text{l}$  de sus

respectivos medios de cultivo. En el compartimento inferior de la cámara se adicionó DMEM (DU145, PC3) o RPMI (LNCaP) con 10% SFB como quimioatrayente. Las células provenían de una incubación de 72 h con sus respectivos tratamientos. Las células que migraron al compartimento inferior se fijaron con metanol absoluto y se tiñeron con azul de toluidina. Se capturaron imágenes y el número de células se contó en un microscopio de luz (objetivo 10x) y con el apoyo de un software (Image J, 1.53. NIH).

### **6.5 Análisis Estadístico.**

Los datos obtenidos representan la media y la desviación (SD). Para conocer si las muestras cumplían el criterio de normalidad se usó la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos presentaron una distribución normal y se analizaron con una prueba de ANOVA para muestras independientes y la comparación entre grupos se realizó con la prueba de Tuckey. En el caso de los ensayos de invasión celular en el que únicamente hubo dos grupos, los datos se analizaron con una T-student no pareada. Las diferencias significativas se representaron con letras diferentes (ANOVA) o con asterisco (t-Student).  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. El tamaño de muestra de cada experimento se indica en los pies de figura. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico Graph Pad Prism 6.01 (San Diego, CA, EE. UU.).

**Tabla III.** Oligonucleótidos utilizados en la reacción de qPCR

<i>Gen</i>	<i>RefSeq ID</i>	<i>Secuencias</i>	<i>(pb)</i>	<i>T°</i>
<i>TNF-α</i>	NM_000594.4.	<b>S:</b> GACAAGCCTGTAGCCCATGT <b>AS:</b> GAGGTACAGGCCCTCTGATG	144	60°C
<i>IL6</i>	NM_001371096.1	<b>S:</b> ACTGGTCTTTTGGAGTTTGAGGT <b>AS:</b> ATT TGTGGTTGGGTCAGGGG	168	60°C
<i>ER-α</i>	NM_000125.4 NM_001122740.2 NM_001122741.2	<b>S:</b> CTACCTGGAGAACGAGCCCA <b>AS:</b> CTGCACAGTAGCGAGTCTCC	170	60°C
<i>ER-β</i>	NM_001437.3 NM_001040275.1	<b>S:</b> AGGAGGTGCGCTCGCTT <b>AS:</b> CTCAAAGATTCGTGGGCAAGT	151	60°C
<i>AR</i>	NM_0000044.4 NM_001348063.1 NM_001348061.1	<b>S:</b> GACCTACGGGGACATGCG <b>AS:</b> TTCCCTTCAGCGGCTCTTTT	175	62°C
<i>PPARγ</i>	NM_001354666.3	<b>S:</b> GACCACTCCCACTCCTTTGA <b>AS:</b> CGACATTCAATTGCCATGAG	474	58°C
<i>GPR30</i>	NM_001039966.2 NM_001505.3	<b>S:</b> GTTCCTCTCGTGCCTCTAC <b>AS:</b> ACCGCCAGGTTGATGAAG	132	60°C
<i>NKX3-1</i>	NM_006167.4 NM_001256339.1	<b>S:</b> AAGAGAACGCCCTCATGCTC <b>AS:</b> TTCTATTTGGGCCACCCTGT	146	61°C
<i>β-actina</i>	NM_001101.4	<b>S:</b> GTCCAGTATGCCTCTGGTCGTAC <b>AS:</b> CACGCTGGTCAGGATCTTCATG	169	58-62°C

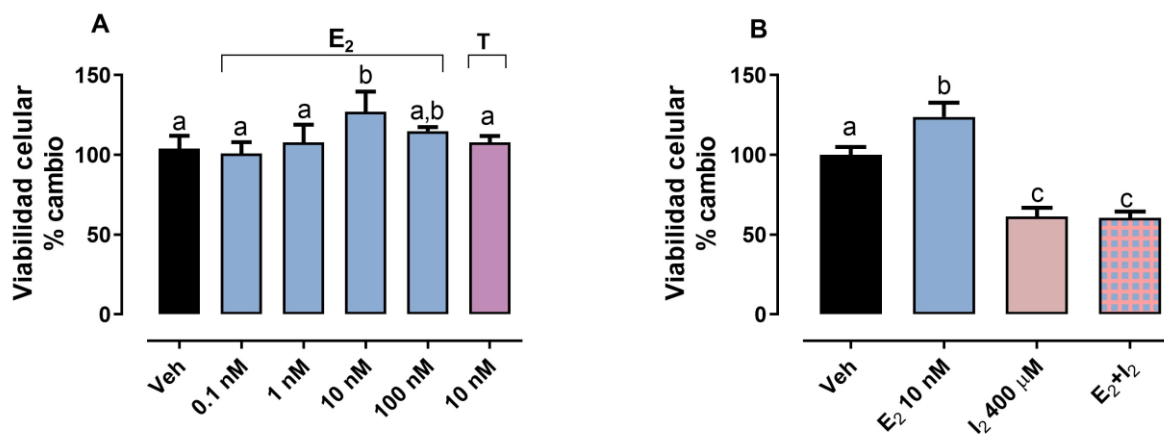
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto dosis respuesta de E<sub>2</sub>, T y/o I<sub>2</sub> en la viabilidad de las células DU145.

La figura 5A muestra que 10 nM de E<sub>2</sub> aumentó 30% el número de células viables respecto al grupo control (vehículo), mientras que este efecto no se observó con dosis más bajas o altas de E<sub>2</sub>. También se evaluaron los efectos de una concentración fisiológica 10 nM de T con el propósito de corroborar la insensibilidad de las células DU145 a los andrógenos (control negativo), o bien evidenciar una acción de T por su posible conversión a E<sub>2</sub>, y se encontró que no modifica la viabilidad celular. La figura 5B muestra que la concentración IC<sub>50</sub> de I<sub>2</sub> (400 μM) disminuye la viabilidad celular en un 39.3 %, efecto que se mantiene en presencia de 10 nM E<sub>2</sub> (40%)

(Fig.

5B).

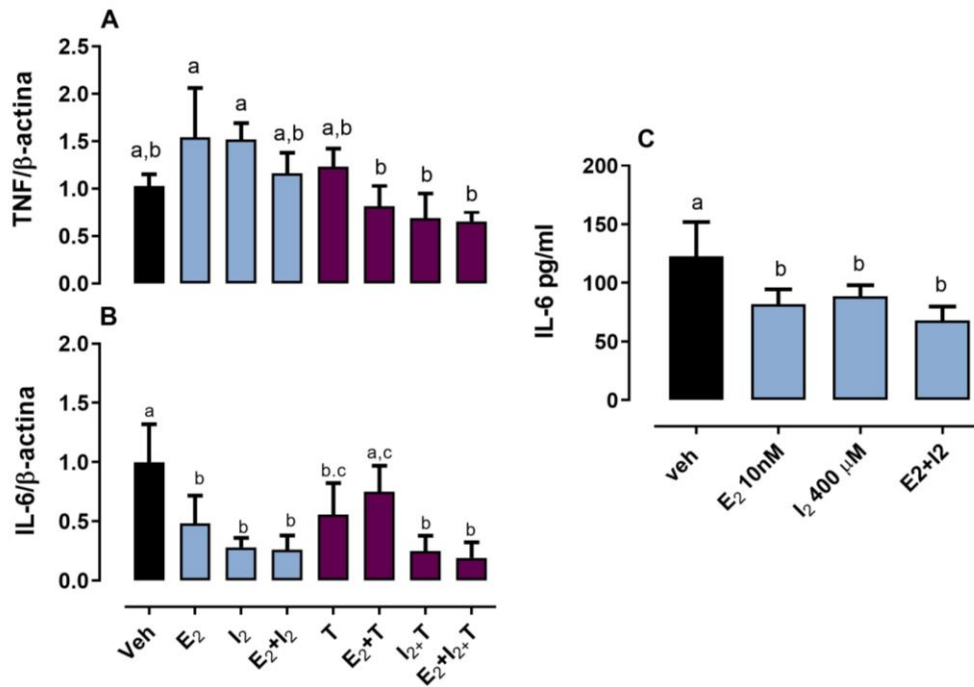


**Figura 5. Efectos del E<sub>2</sub> y/o I<sub>2</sub> en la viabilidad celular de la línea DU145.** (A-B) Las células fueron tratadas por 96 h y el número de células viables está normalizado respecto al grupo control (vehículo). Se utilizó 0.1% de etanol como vehículo. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA de una vía y las diferencias entre medias se evaluaron mediante la prueba de Tukey. Las barras representan la media ± SD, las letras diferentes entre grupos indican diferencias significativas P < 0.05. n = 6 experimentos independientes por duplicado.

### 7.2 Efectos de E<sub>2</sub>, T y I<sub>2</sub> en la expresión de TNF-α y la secreción de IL6 en células DU145.

Los tratamientos individuales o combinados de 10 nM E<sub>2</sub>, y/o 400 μM I<sub>2</sub> no modificaron la expresión de TNF-α respecto al control. La T 10nM tampoco la modificó, pero una menor

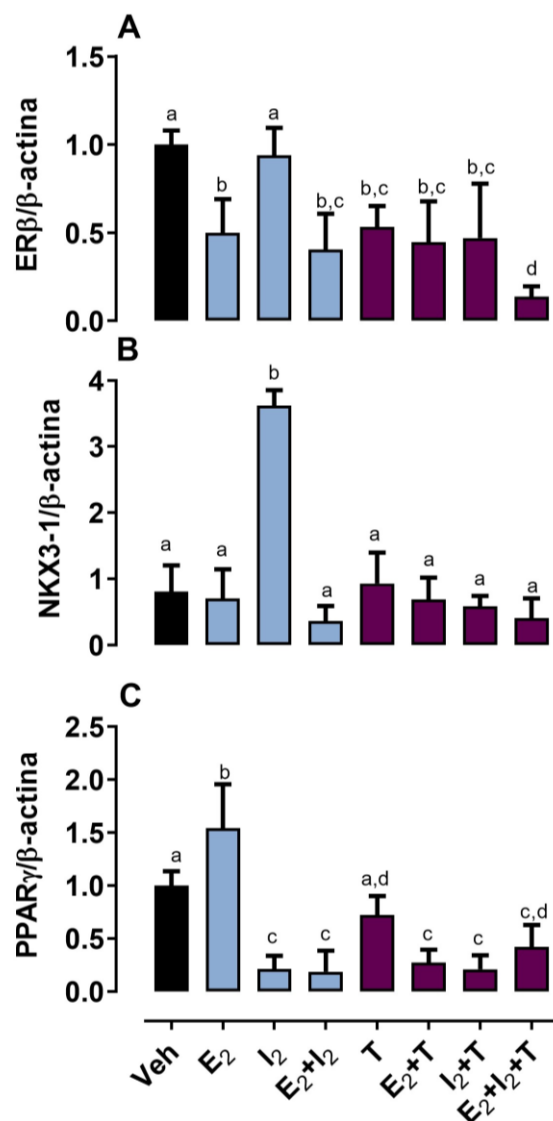
expresión fue observada en los grupos combinados E<sub>2</sub>+T, I<sub>2</sub>+T y E<sub>2</sub>+I<sub>2</sub>+T respecto a los grupos de solo E<sub>2</sub> o I<sub>2</sub> respectivamente (Fig. 6A). Por otra parte, los tratamientos con E<sub>2</sub>, T y/o I<sub>2</sub> disminuyeron la expresión de IL6 respecto al control, permaneciendo reducida la expresión en los grupos combinados, excepto en el grupo E<sub>2</sub>+T (Fig. 6B). La figura 6C indica que los tratamientos con E<sub>2</sub>, y/o I<sub>2</sub>, o la combinación de ambos (81.6, 88.6 y 67.7 ng/ml, respectivamente) además de impactar en la expresión también reduce la secreción de IL6 al medio de cultivo en comparación al vehículo (122.7 ng/ml).



**Figura 6. Efectos del I<sub>2</sub> y de la co-incubación I<sub>2</sub>-esteroides en la expresión génica de citocinas proinflamatorias y secreción de IL6 en la línea DU-145.** (A-B) Se analizó la expresión génica de TNF e IL6 tras los tratamientos con 10nM de E<sub>2</sub> o T y 400μM de I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> a las 48 h por PCR en tiempo real. (C) La cuantificación de IL6 en el medio de cultivo se analizó por ELISA a partir de un ensayo realizado con 100,000 células las cuales fueron tratadas por 96 h. Se utilizó 0.1% de etanol como vehículo. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía y las diferencias entre medias se evaluaron mediante la prueba de Tukey. Las barras representan la media ± SD las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos. P < 0.05. n=3 a 6 experimentos por duplicado.

### **7.3 Efectos del E<sub>2</sub>, y/o T en presencia o ausencia de I<sub>2</sub> en la expresión de ERβ, Nkx31 y PPARγ en las células DU145**

En esta tesis se encontró y corroboró que las células DU145 no expresan el receptor nuclear de andrógenos (AR), ni el receptor a estrógenos ERα, pero expresan el ERβ (Anexo 1). Se observó que los tratamientos individuales y combinados de E<sub>2</sub> y/o T disminuyeron la expresión del ERβ respecto al vehículo. El I<sub>2</sub> no modificó dicha expresión y no influyó en la inhibición mediada por el E<sub>2</sub> o T. Sin embargo, la más baja expresión del ERβ fue observada en el grupo E<sub>2</sub>+I<sub>2</sub>+T evidenciando una compleja combinación de estos factores. Nkx3-1 es un gen regulado a través del receptor nuclear AR y como era de esperarse, la T o E<sub>2</sub> no regularon la expresión en estas células carentes del receptor (Figura 7B), mientras que el I<sub>2</sub> la aumentó y la T canceló este efecto (T+I<sub>2</sub>). Por otra parte, el E<sub>2</sub> aumentó la expresión de PPARγ mientras que los tratamientos con I<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>+I<sub>2</sub> la disminuyeron, respecto al control o E<sub>2</sub>, respectivamente. La T no modificó la expresión de PPARγ respecto al control, pero inhibió la estimulación mediada por E<sub>2</sub> en el grupo E<sub>2</sub>+T y no influyó en el efecto inhibitorio del I<sub>2</sub>.

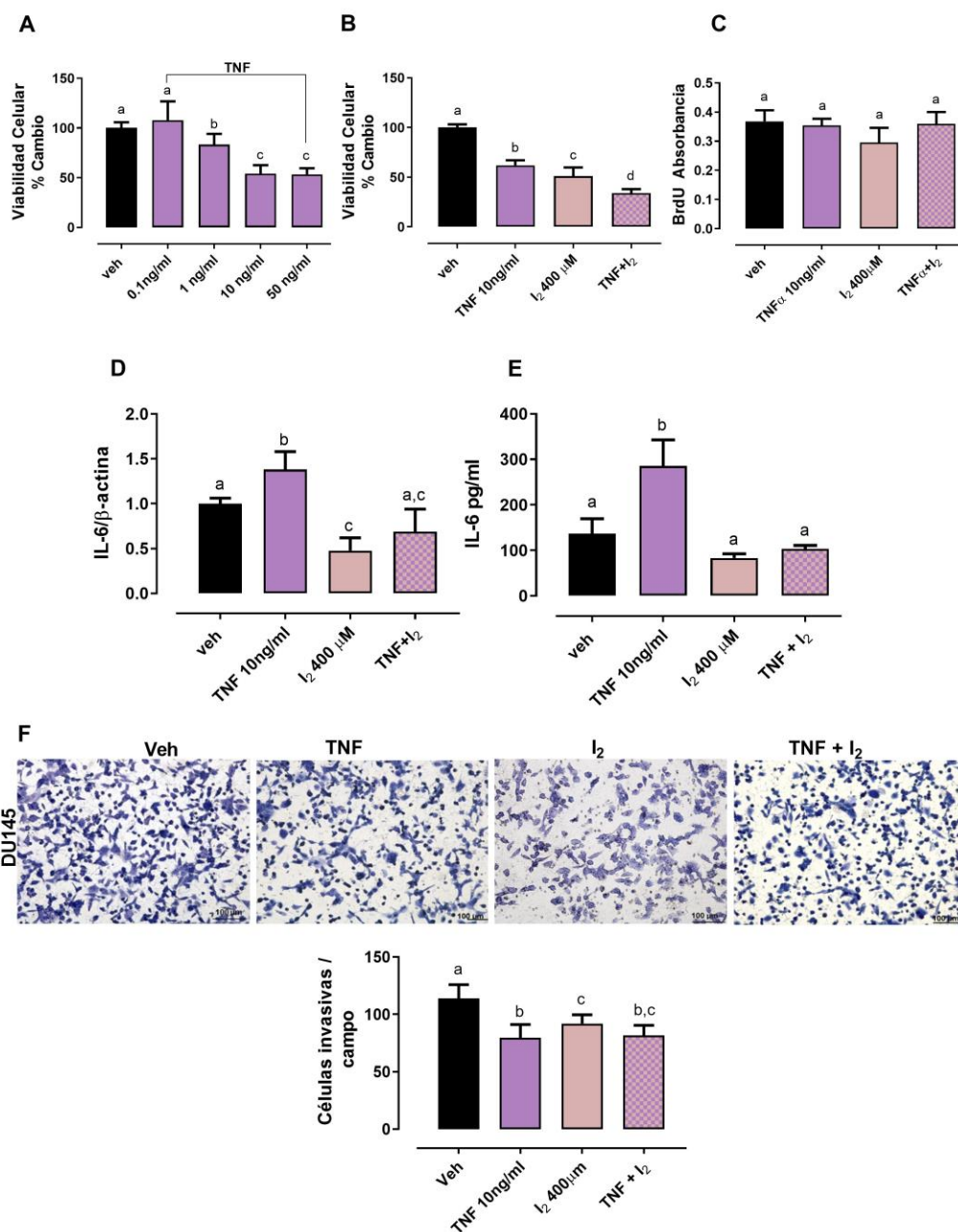


**Figura 7. Efectos del I<sub>2</sub> y de la combinación I<sub>2</sub>-esteroides en la expresión génica de receptores en la línea DU145.** La expresión génica se analizó a las 48 h por PCR en tiempo real. Se utilizó 01% de etanol como vehículo. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía y las diferencias entre medias se evaluaron mediante la prueba de Tukey. Las barras representan la media ± SD las letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos. P < 0.05. n= 4 a 6 experimentos por duplicado.

#### **7.4 Efectos del I<sub>2</sub> y/o TNF- $\alpha$ en la viabilidad, la proliferación celular, la secreción de IL6 y la capacidad invasiva en las células representativas de cáncer prostático.**

La figura 8A muestra que el TNF- $\alpha$  disminuyó la viabilidad de las células DU145 de manera dosis-dependiente a partir de la concentración de 1 ng/ml. En el grupo tratado con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  y I<sub>2</sub> se encontró un efecto aditivo en la pérdida de la viabilidad celular, respecto a los tratamientos individuales (Figura 8B). Los tratamientos individuales o combinados con TNF- $\alpha$  y/o I<sub>2</sub> no disminuyeron la proliferación celular (incorporación BrdU análogo de timidina), (Figure 8C). Por otra parte, el TNF- $\alpha$  aumentó la expresión y la secreción al medio de cultivo de IL6 (Figuras 8D-E) y el I<sub>2</sub> redujo la secreción basal y canceló el efecto estimulador del TNF- $\alpha$ . La figura 8F muestra que los tratamientos individuales con TNF- $\alpha$  y/o I<sub>2</sub> disminuyeron la capacidad invasiva y esta reducción permaneció en el grupo combinado. Adicionalmente al analizar otras líneas celulares, se encontró que el tratamiento únicamente con I<sub>2</sub> también redujo la capacidad invasiva en líneas celulares dependientes (LNCaP) e independientes de andrógenos (PC3) (Figure 9).

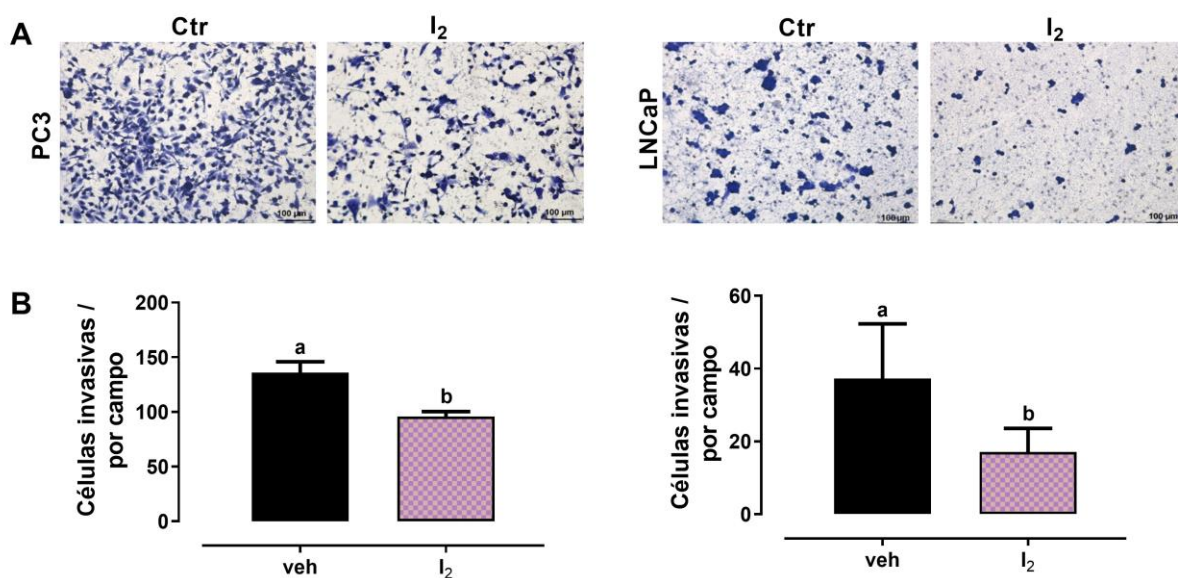




**Figura 8. Efectos de TNF- $\alpha$  y/o I<sub>2</sub> en diversos procesos celulares en la línea DU145**

Efecto dosis-respuesta de TNF- $\alpha$  y efectos del I<sub>2</sub> y/o TNF- $\alpha$  en la viabilidad celular a las 72 h de tratamiento (A-B). Los datos se representan como porcentaje de cambio respecto al vehículo. Se utilizó BSA (0.1% en solución de fosfatos) como vehículo (C). Las células fueron pretratadas por 48 h y la incorporación de BrdU se analizó en 50,000 células durante 6 h. (D-E) Expresión (mRNA) y secreción de IL6 al medio de cultivo. (F) Imagen representativa y cuantificación del número de células invasivas en células pretratadas por 24 h con vehículo, TNF- $\alpha$ , I<sub>2</sub> o la combinación de ambos como lo muestra la figura. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía y las diferencias entre medias se evaluaron mediante la prueba de Tukey.

Las barras representan la media  $\pm$  SD las letras diferentes indican diferencias significativas  $P < 0.05$ .  $n = 4$  a  $8$  experimentos.



**Figura 9. Efectos del I<sub>2</sub> en la capacidad de invasión de las células LNCaP y PC3 (A).** Las células fueron tratadas por 24 h. Imágenes representativas de la cámara inferior de invasión tomadas por un microscopio invertido (objetivo 10x). (B) Análisis cuantitativo por campo. Las barras representan la media  $\pm$  SD los datos se analizaron con la prueba t-Student  $n=3$  experimentos independientes por duplicado.

## 8. DISCUSIÓN

En la presente tesis se estudiaron por primera vez los efectos directos de la combinación I<sub>2</sub>-esteroides o I<sub>2</sub>- TNF- $\alpha$  en un modelo *in vitro* de cáncer prostático. Está bien establecido que mantener las concentraciones fisiológicas de andrógenos y estrógenos, es crucial para conservar la integridad y la función de la próstata (Chan et al., 2014; Di Zazzo et al., 2018; Rahman et al., 2016); y se reconoce que excesos, deficiencias o cambios en la proporción de estos esteroides, induce alteraciones prostáticas a diferentes niveles (King et al., 2006; Prins & Korach 2008;). Un desbalance a favor de los E<sub>2</sub> genera inflamación de la próstata (Vignozzi et al., 2016) y, en el cáncer prostático, promueve efectos anti- o pro-tumorales, dependiendo del tipo o variantes del receptor a E<sub>2</sub> (Christoforou et al., 2014).

Por otra parte, se conoce que el I<sub>2</sub> induce pérdida de la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer prostático (Aranda et al., 2013), pero se desconoce si estos efectos se conservan, se pierden o se exacerban ante un reto con E<sub>2</sub>. Como modelo para estudiar la combinación I<sub>2</sub>-E<sub>2</sub>, se seleccionó la línea celular DU145, la cual es insensible a la acción de los andrógenos, pero es sensible a los E<sub>2</sub> y posee un alto potencial invasivo. Por lo que, se estudiaron los efectos individuales y/o combinados del I<sub>2</sub> y E<sub>2</sub> en la viabilidad, la proliferación celular, la capacidad invasiva y la producción de IL6.

En este trabajo se corroboró que las células DU145 no expresan el AR y se encontró que tampoco expresan el ER $\alpha$ , pero si expresan el ER $\beta$ . Aunque este patrón de expresión génica (ER $\alpha$ <sup>-</sup>, ER $\beta$ <sup>+</sup>) concuerda con algunos estudios previos (Lau et al., 2000; Linja et al., 2003), también hay estudios que muestran que ambos tipos de receptores no se expresan en esta línea celular (Hobisch et al., 1997; Nojima et al., 2001). Los estudios funcionales mostraron que la estimulación con 10 nM de E<sub>2</sub> aumentó el número de células viables. Sin embargo, concentraciones menores o mayores no tuvieron ningún efecto. Se desconoce la relevancia biológica de este aumento, pero esto también ha sido observado en las líneas celulares LNCaP y PC3 (RNAold et al., 2005; Lombardi et al., 2020). En las células DU145, el efecto positivo del E<sub>2</sub> en la viabilidad sugiere una inhibición de la muerte celular, no obstante, la activación del ER $\beta$  está relacionada con apoptosis y no con proliferación celular. Sin embargo, el E<sub>2</sub>

disminuyó la expresión del *ERβ* y aunque la posible inhibición parcial de esta vía podría explicar dicho aumento, los mecanismos no mediados por *ERβ* podrían también estar involucrados. La regulación negativa de este receptor contrasta con lo observado en células PC3, en las que dosis fisiológicas de  $E_2$  estimulan su expresión (Pisolato et al., 2016), sugiriendo una regulación específica dependiendo del tipo celular. Contrario a lo reportado en la próstata normal (Harris et al., 2000), el  $E_2$  no reguló la expresión del TNF- $\alpha$ , pero disminuyó la expresión y la secreción de IL6. Estudios moleculares muestran que la sobreexpresión de *ERβ* reduce la expresión de citocinas inflamatorias en células DU145 y PC3 (Xiao et al., 2019), sugiriendo que la activación del complejo  $E_2/ER\beta$  podría mediar la disminución de IL6. A su vez, el  $E_2$  aumentó la expresión génica de *PPAR $\gamma$*  (anti-inflamatorio), lo que también podría explicar la reducida producción de IL6.

En el presente estudio se incluyó un grupo tratado con T con el propósito de evaluar un posible efecto de T a través de su conversión a  $E_2$ , dado que las células DU145 expresan la enzima aromatasa (Negri-Cesi et al., 1999). La dosis fisiológica de T no impactó en la viabilidad celular, ni en la expresión de *Nkx3.1*, un gen blanco del AR, corroborando la ausencia de este receptor en estas células. El andrógeno no modificó la expresión de TNF- $\alpha$ , pero disminuyó la expresión de IL6 y del *ERβ*, lo cual podría ser explicado a través de su aromatización, dado que este efecto inhibitorio fue también observado con  $E_2$ . Sin embargo, esta concordancia no fue observada en *PPAR $\gamma$* , dado que solo el  $E_2$  y no T aumentó su expresión, sugiriendo que la T podría actuar por un mecanismo independiente del AR. Hasta aquí, nuestros resultados confirman la sensibilidad de las células DU145 a la acción del  $E_2$  y T, evidenciando un efecto inhibitorio sobre la secreción de IL6.

Por otra parte, se corroboró que el  $I_2$  reduce la viabilidad de las células DU145 (Aranda et al., 2013) y se demostró que también disminuye la proliferación y la capacidad invasiva, y que esto último se extiende a las líneas celulares LNCaP y PC3. Los efectos antiproliferativos y anti-invasivos aquí observados, son consistentes con lo reportado en líneas celulares de cáncer mamario y neuroblastoma (MDA-MB231) (Tripathi et al., 2016, Mendieta et al., 2019). Aquí no se exploraron los efectos del  $I_2$  en la apoptosis, pero se conoce que este la activa en células de cáncer prostático, mamario y neuroblastoma (Shrivastava et al., 2006, Aranda et al., 2013;

Mendieta et al., 2020). La apoptosis junto con la acción antiproliferativa, permite explicar la pérdida de la viabilidad celular. De igual manera, el I<sub>2</sub> disminuyó tanto la expresión como la secreción basal de IL6. Esta citocina actúa como un factor proliferativo en células de cáncer prostático (Okamoto & Oyasu et al., 1997) y aunque parece ser que una baja producción de IL6 se asocia con una menor tasa de proliferación, esta relación negativa no se observa en el grupo con E<sub>2</sub>, confirmando que la proliferación depende de múltiples factores. Un resultado aparentemente inesperado fue que el I<sub>2</sub> aumentó la expresión de *NKX3-1*, un factor de transcripción regulado por andrógenos que en la próstata normal actúa como antiinflamatorio y en el cáncer de próstata como supresor de tumores (Le Magnen et al., 2018; Antao et al., 2021). La implicación de estos hallazgos se desconoce, pero su análisis debe ser reconsiderado en estudios posteriores.

Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que el I<sub>2</sub> induce la formación de un yodolípido (6-yodolactona) (Aceves et al., 2013), el cual aumenta la expresión y/o activación de los receptores PPAR $\gamma$  en células de cáncer mamario y/o neuroblastoma (Shrivastava et al., 2016; Mendieta et al., 2020). Sin embargo, en el presente estudio se mostró que el I<sub>2</sub> redujo la expresión de PPAR $\gamma$ , mientras que un estudio farmacológico evidenció que los efectos del I<sub>2</sub> en la viabilidad celular no parecen depender de la activación de estos receptores (Anguiano et al., 2023). Los mecanismos del I<sub>2</sub> se están empezando a entender, pero la combinación I<sub>2</sub>-E<sub>2</sub> mostró interacciones recíprocas. El I<sub>2</sub> previno el efecto proliferativo y expresión de PPAR $\gamma$  inducida por E<sub>2</sub> y el E<sub>2</sub> previno el aumento en la expresión de *NKX3-1* inducido por I<sub>2</sub>. Aunque la relevancia de esta regulación negativa debe ser estudiada a nivel de proteína, un estudio *in vivo* mostró que el I<sub>2</sub> en coordinación con la T previene la inflamación de la próstata inducida por E<sub>2</sub> (Anguiano et al., 2023), evidenciando una compleja acción I<sub>2</sub>-esteroides.

TNF- $\alpha$  es una citocina que, a través de distintas vías de señalización, induce efectos inflamatorios (vía NF $\kappa$ B) y apoptóticos (vía caspasa 8) (Wang et al., 2009) que conducen a la muerte celular, la inflamación y la progresión del cáncer de próstata. Como se esperaba, el TNF- $\alpha$  aumentó la expresión y la secreción de IL6 y redujo la viabilidad celular de las células DU145. Un resultado inesperado y no fácil de explicar fue que también TNF- $\alpha$  disminuyó el potencial invasivo de estas células. En esta línea celular, hay evidencia que una concentración

baja (10 ng/ml) de TNF- $\alpha$  estimula la proliferación celular, mientras que concentraciones mayores a 20 ng/ml, inducen apoptosis y aumentan el potencial invasivo (Blasko et al., 1997; Maolake et al., 2017). En otras líneas celulares de cáncer de próstata, se ha observado que el TNF- $\alpha$  aumenta la migración a través de la secreción de quimiocina CCL21, la cual es un ligando del receptor CCR7 (Maolake et al., 2018). Las discrepancias podrían ser explicadas por el hecho de que nuestro ensayo se realizó en presencia de SFB, mientras que los otros estudios se realizaron en condiciones libres de suero. La interacción I<sub>2</sub>- TNF- $\alpha$  mostró que el primero contrarresta la secreción de IL6 inducida por TNF- $\alpha$  y que con ambos se potencia la pérdida de la viabilidad, pero no el efecto anti-proliferativo, sugiriendo la participación también de un mecanismo apoptótico. Se conoce que la señalización de TNF- $\alpha$  conduce a la apoptosis (Wang et al., 2009) y a la progresión del tumor, a través de regular la expresión de citocinas (Srinivasan et al., 2010; Gough & Myles 2020). Las líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y PC3 son parcialmente resistentes a la apoptosis, pero sensibles a la activación de NF $\kappa$ B/IL6 estimulada por TNF- $\alpha$  (Sumitomo et al., 1999; Srinivasan et al., 2010). El TNF- $\alpha$  es una citocina de potencial valor terapéutico por su capacidad de estimular la inmunidad antitumoral *in vivo* (Tse et al., 2012), por lo que, la interacción I<sub>2</sub>-citocinas debe ser estudiada con mayor precisión.

En conjunto, en este trabajo se evidenció que la combinación I<sub>2</sub>-E<sub>2</sub> o I<sub>2</sub>- TNF- $\alpha$  induce *in vitro* efectos antineoplásicos, por lo que resulta relevante entender los mecanismos, dado que la deregulación estrogénica y la inflamación son condiciones que se suman a los factores de riesgo y/o progresión de las patologías prostáticas.

## 9. Conclusiones

Los resultados en las células DU145 sugieren que las acciones anti-cáncer del I<sub>2</sub> prevalecen ante el estímulo de E<sub>2</sub> o TNF- $\alpha$  sugiriendo que el aporte del I<sub>2</sub> podría potencialmente ser utilizado como terapia en tumores de próstata independientes de andrógenos.

Los efectos antagónicos y/o permisivos del I<sub>2</sub> en combinación con E<sub>2</sub> o TNF- $\alpha$ , revelan mecanismos moleculares complejos.

Los efectos del I<sub>2</sub> no parecen estar mediados por la expresión de PPAR $\gamma$  sugiriendo que este proceso no es crucial para la acción del I<sub>2</sub>.

Se requieren investigaciones adicionales para profundizar en los efectos y mecanismos del I<sub>2</sub> en modelos *in vitro* e *in vivo* de CaP.

## 10. REFERENCIAS

- Aceves C., Anguiano B., Delgado G. 2013. The Extrathyronine Actions of Iodine as Antioxidant, Apoptotic, and Differentiation Factor in Various Tissues. *Thyroid*. 23, 1-11.
- Aceves C, Mendieta I, Anguiano B, Delgado-González E. 2021. Molecular Iodine Has Extrathyroidal Effects as an Antioxidant, Differentiator, and Immunomodulator. *International Journal of Molecular Sciences*.7;22(3).
- Álvarez-León, W., Mendieta, I., Delgado-González, E., Anguiano, B., & Aceves, C. 2021. Molecular Iodine/Cyclophosphamide Synergism on Chemoresistant Neuroblastoma Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8936.
- 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(1), 45.
- Anguiano, B., Álvarez, L. R., Delgado-González, E., Ortiz-Martínez, Z., De, C. M., Morales, G. B., & Aceves, C. 2023 Protective effects of iodine on rat prostate inflammation induced by sex hormones and on the DU145 prostate cancer cell line treated with TNF. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 572, 111957.
- Antao, A. M., Ramakrishna, S., & Kim, K. S. 2021. The Role of Nkx3.1 in Cancers and Stemness. *International Journal of stem cells*, 14(2), 168–179.
- 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, 32-41.
- Arenas NJ., Moreno LA, Carrillo AP, Fonseca CL and Daza FP. 2014. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. Literature review. *Colombian Urology*. 23, 39-43.



- Arnold, JT, Le, H., McFann, KK y Blackman, MR 2005. Comparative effects of DHEA vs. testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol on proliferation and gene expression in human LNCaP prostate cancer cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(3), E573–E584.
- Asadi, FK., y Sharifi, R. 1995. Effects of sex steroids on cell growth and C-myc oncogene expression in LN-CaP and DU-145 prostatic carcinoma cell lines. *Urología y Nefrología Internacional*, 27(1), 67–80.
- Babinski, M. A., Chagas, M. A., Costa, W.S., & Pereira, M. J.. 2002. MORFOLOGÍA Y FRACCIÓN DEL ÁREA DEL LUMEN GLANDULAR DE LA ZONA DE TRANSICIÓN EN LA PRÓSTATA HUMANA. *Revista chilena de anatomía*, 20(3), 255-262.
- Bandini M., Gandaglia G., Briganti A. 2017. Obesity and prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 27,415-421.
- Bernardo-Filho M., Barbosa Junior M.L., da Cunha Sá-Caputo D., De Aguiar Ede O., De Lima R.P., Santos-Filho S.D. et al., 2014, The relevance of the procedures related to the physiotherapy in the interventions in patients with prostate cancer: Short review with practice approach, *International Journal of Biomedical Science* 10(2), 73–84.
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A y Katzenellenbogen, BS.1986). El rojo de fenol en los medios de cultivo de tejidos es un estrógeno débil: implicaciones relacionadas con el estudio de células sensibles al estrógeno en cultivo. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América*, 83 (8), 2496–2500
- Bilal., MY, Dambaeva, S., Kwak-Kim, J., Gilman-Sachs, A. y Beaman, KD. 2017. Un papel del yoduro y la tiroglobulina en la modulación de la función de las células inmunes humanas. *Frontiers in immunology*.
- Bosland M. C. 2005. The role of estrogens in prostate carcinogenesis: a rationale for chemoprevention. *Reviews in urology*. 7 Suppl 3(Suppl 3), S4–S10.
- Butler, W., & Huang, J. 2021. Neuroendocrine cells of the prostate: Histology, biological functions, and molecular mechanisms. *Precision Clinical Medicine*, 4(1), 25–34.

- Brian, W. C. Tse, Kieran F. Scott, Pamela J. Russell. 2012. Paradoxical Roles of Tumour Necrosis Factor-Alpha in Prostate Cancer Biology Prostate Cancer.
- Carruba, G. 2007, Estrogen and prostate cancer: An eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *J. Cell. Biochem.* 102, 899-911.
- Castagnetta, LA, Miceli, MD, Sorci, CM, Pfeffer, U., Farruggio, R., Oliveri, G, Carruba, G. 1995. El estradiol estimula el crecimiento de las células de cáncer de próstata humano LNCaP a través de su propio receptor. *Endocrinología*, 136 (5), 2309-2319.
- Center MM., Jemal A., Lortet-Tieulent J., Ward E., Ferlay J., Brawley O., Bray F. 2012. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol.* 61, 1079-92.
- Chan SC., and Dehm SM. 2014. Constitutive Activity of the Androgen Receptor. *Adv Pharmacol.* 70, 327– 366.
- Chan, Q. K. Y., Lam, H.-M., Ng, C.-F., Lee, A. Y. Y., Chan, E. S. Y., Ng, H.-K., ... Lau, K.-M. 2010. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21 and induction of G2 cell-cycle arrest. *Cell Death & Differentiation*, 17(9), 1511–1523.
- Chang, M. A., Patel, V., Gwede, M., Morgado, M., Tomasevich, K., Fong, E. L., ... Delk, N. A. 2014. IL-1 $\beta$  Induces p62/SQSTM1 and Represses Androgen Receptor Expression in Prostate Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(12), 2188–2197.
- Christoforou, P., & Christopoulos, P. 2014. The Role of Estrogen Receptor  $\beta$  in Prostate Cancer *Molecular Medicine*, 20(1), 1.
- Chun, J. Y., Nadiminty, N., Dutt, S., Lou, W., Yang, J. C., Kung, H.-J., ... Gao, A. C. (2009). Interleukin-6 Regulates Androgen Synthesis in Prostate Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 15(15), 4815–4822.
- Chlenski, A., Nakashiro, K., Ketels, K. V., Korovaitseva, G. I., & Oyasu, R. 2001. Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 47(1), 66–75.

- Dai C., Heemers H., Sharifi N. 2017. Androgen Signaling in Prostate Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med.
- Davey RA., and Grossmann M. 2016. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. Clin Biochem Rev. 37, 3–15.
- De la Vieja A, Santisteban P. 2018. Role of iodide metabolism in physiology and cancer. Endocrine-Related Cancer. 225-245
- Di Croce, L., Okret, S., Kersten, S., Gustafsson, J.-Å., Parker, M., Wahli, W. and Beato, M. 1999. Steroid and nuclear receptors Villefranche-sur-Mer, France, The EMBO Journal. 18, 62016210.
- Di Zazzo, E., Galasso, G., Giovannelli, P., Di Donato, M., & Castoria, G. 2018. Estrogens and Their Receptors in Prostate Cancer: Therapeutic Implications. Frontiers in oncology. 8, 2.
- Douglas Hanahan; Robert A. Weinberg. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. , 144(5), 646–674.
- Ellem SJ, Risbridger GP. Aromatase and regulating the estrogen: androgen ratio in the prostate gland. 2010. J Steroid Biochem Mol Biol. 118, 246–51.
- Ellem, S. J., Schmitt, J. F., Pedersen, J. S., Frydenberg, M., & Risbridger, G. P. 2004. Local Aromatase Expression in Human Prostate Is Altered in Malignancy. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89(5), 2434–2441.
- Frick, J. y Aulitzky, W. 1991. Fisiología de la próstata. Infección, 19(S3), S115–S118.
- Gadkar, S., Nair, S., Patil, S., Kalamani, S., Bandivdekar, A. H., Patel, V., Chaudhari, U., & Sachdeva, G. 2019. Membrane-initiated estrogen signaling in prostate cancer: A route to epithelial-to-mesenchymal transition. Molecular Carcinogenesis, 58(11), 2077–2090.
- García-Figueroa, I., Candia, M. N., Pereda-Meira, C. M., & Laborí-Carda, C. M. 2015. Papel de los estrógenos y sus receptores en las enfermedades benignas y malignas prostáticas: Parte 1. Revista Mexicana de Urología, 75(5), 283–291.

- Gueron, G., Cotignola, J., & Vazquez, E. 2013. Inflammatory Microenvironment in Prostate Carcinogenesis. *Advances in Prostate Cancer*.
- Grino, P. B., Griffin, J. E., & Wilson, J. D. 1990. Testosterone at High Concentrations Interacts with the Human Androgen Receptor Similarly to Dihydrotestosterone\*. *Endocrinology*, 126, 1165–1172
- Grindstad, T., Skjefstad, K., Andersen, S., Ness, N., Nordby, Y., Al-Saad, S., Fismen, S., Donnem, T., Khanekhenari, M. R., Busund, L., Bremnes, R. M., & Richardsen, E. (2016). Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and aromatase as independent predictors for prostate cancer outcome. *Scientific Reports*, 6(1).
- Gottardi W. 1999. Iodine and disinfection: theoretical study on mode of action, efficiency, stability, and analytical aspects in the aqueous system. *Archiv der Pharmazie*, 332 151–157.
- Gough P., Myles IA. 2020. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Front Immunol*. 11-585880
- Gorowska-Wojtowicz, Ewelina, Michal Duliban, Malgorzata Kotula-Balak, and Barbara Bilinska. 2022. "Modulatory Effects of Estradiol and Its Mixtures with Ligands of GPER and PPAR on MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways and Tumorigenic Factors in Mouse Testis Explants and Mouse Tumor Leydig Cells" *Biomedicines* 10, 6-1390.
- Harris, M. T., Feldberg, R. S., Lau, K.-M., Lazarus, N. H., & Cochrane, D. E. 2000. Expression of proinflammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat prostate. *The Prostate*, 44(1), 19–25.
- Hermabessière, J., & Taillandier, J. 2002. Fisiología de la próstata. *EMC - Urología*, 34(1), 1–6
- Heemers HV, Tindall DJ. 2007. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*. 28,778-808.

- Hughes C., Murphy A., Martin C., Sheils O. and O'Leary J. 2005. Molecular pathology of prostate cancer. *J. Clin. Pathol.* 58,673–684.
- Hobisch, A., Hittmair, A., Daxenbichler, G., Wille, S., Radmayr, C., Hobisch-Hagen, P., ... Culig, Z. 1997. Metastatic lesions from prostate cancer do not express oestrogen and progesterone receptors. *The Journal of Pathology*, 182(3), 356–361.
- Ibabe, A., Herrero, A., & Cajaraville, M. P. 2005. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by PPAR $\alpha$ - and PPAR $\gamma$ -specific ligands and by 17 $\beta$ -estradiol in isolated zebrafish hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 19(6), 725–735.
- Inokuchi J, Narula N, Yee DS, Skarecky DW, Lau A, Ornstein DK, Tyson DR.2009. Annexin A2 positively contributes to the malignant phenotype and secretion of IL6 in DU145 prostate cancer cells. *Int J cancer* 124, 68-74.
- J. Monserrat Sanz, A.M. Gómez Lahoz, A. Silva. 2021. El sistema inmune y el microambiente tumoral: componentes y función, *Medicine Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. Volume 13, Issue 33
- Jayasooriya RG, Lee YG, Kang CH, Lee KT, Choi YH, Park SY, Hwang JK, Kim GY.2013. Piceatannol inhibits MMP-9-dependent invasion of tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated DU145 cells by suppressing the Akt-mediated nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *Oncol Lett.* 5(1):341-347.
- Jia, Yl., Liu, X., Yan, Jy.Chong Lm., Li L., Ma Ac., Zu Ys. 2015. The alteration of inflammatory markers and apoptosis on chronic prostatitis induced by estrogen and androgen. *Int Urol Nephrol* 47, 39–46.
- Kanda, Y., Osaki, M., & Okada, F. 2017. Chemopreventive Strategies for Inflammation-Related Carcinogenesis: Current Status and Future Direction. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 867.
- Kannan A., Kirkman M., Ruseckaite R., Evans SM. 2019. Prostate care and prostate cancer from the perspectives of undiagnosed men: a systematic review of qualitative research. *BMJ Open.* 9 e022842.

- Kimura SH, Ikawa M, Ito A, Okabe M, Nojima H. 2001. Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene*. 20, 3290–3300.
- King, K. J., Nicholson, H. D., & Assinder, S. J. 2006. Effect of increasing ratio of estrogen: Androgen on proliferation of normal human prostate stromal and epithelial cells, and the malignant cell line LNCaP. *The Prostate*, 66(1), 105–114.
- Kumar, V. L., & Majumder, P. K. (1995). Prostate gland: Structure, functions and regulation. *International Urology and Nephrology*, 27(3), 231–243.
- Krušlin B., Tomas D., Džombeta T., Milković-Periša M., Ulamec M. 2017. Inflammation in Prostatic Hyperplasia and Carcinoma-Basic Scientific Approach. *Front Oncol*, 25, 77.
- Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM. 2000. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res*. 15;60(12):3175-82.
- Lau, K.-M., Ma, F. M.-T., Xia, J. T., Chan, Q. K. Y., Ng, C.-F., & To, K.-F. 2017. Activation of GPR30 stimulates GTP-binding of Gαi1 protein to sustain activation of Erk1/2 in inhibition of prostate cancer cell growth and modulates metastatic properties. *Experimental Cell Research*, 350(1), 199–209.
- Lafront, C., Germain, L., Weidmann, C., & Audet-Walsh, É. 2020. A Systematic Study of the Impact of Estrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators on Prostate Cancer Cell Proliferation. *Scientific Reports*, 10 (1).
- Le Magnen, C., Virk, R. K., Dutta, A., Kim, J. Y., Panja, S., Lopez-Bujanda, Z. A., Abate-Shen, C. 2018. Cooperation of loss of NKX3.1 and inflammation in prostate cancer initiation. *Disease Models & Mechanisms*, dmm.035139.
- Leslie S.W., Soon-Sutton T.L., Sayjad H., Siref L.E. Cancer de prostata. [Actualizado el 12 de mayo de 2022]. En: StatPearls. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>

- Levin E.R., Hammes S.R., 2016. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*
- Linja, M. J., Savinainen, K. J., Tammela, T. L. J., Isola, J. J., & Visakorpi, T. 2003. Expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in prostate cancer. *The Prostate*, 55(3), 180–186.
- Lombardi, A. P. G., Pisolato, R., Vicente, C. M., Lazari, M. F. M., Lucas, T. F. G., & Porto, C. S. 2016. Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) mediates expression of  $\beta$ -catenin and proliferation in prostate cancer cell line PC-3. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 430, 12–24.
- Marker P.C., Donjacour A.M., Dahiya R., Cunha G.R. 2003. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. 253, 165-74.
- Maolake, A., Izumi, K., Natsagdorj, A., Iwamoto, H., Kadomoto, S., Makino, T., ... Mizokami, A. 2018. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces prostate cancer cell migration in lymphatic metastasis through CCR7 upregulation. *Cancer Science*, 109(5), 1524–1531.
- McNeal, J. E. 1981. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 2, 35–49.
- Merriel SD., Funston G., and Hamilton W. 2018. Prostate Cancer in Primary Care. *Advances in Therapy*, 35, 1285-1294.
- Mendieta, I., Nuñez Anita, R., Nava Villalba, M., Zambrano Estrada, X., Delgado Gonzáles, E., Anguiano, B., & Aceves, C. 2019. Molecular iodine exerts antineoplastic effects by diminishing proliferation and invasive potential and activating the immune response in mammary cancer xenografts. *BMC Cancer*, 19, 261.
- Mendieta, I., Rodríguez-Gómez, G., Rueda-Zarazúa, B., Rodríguez-Castelán, J., Álvarez-León, W., Delgado-González, E., . . . Aceves, C. (2020). Molecular iodine synergized and sensitized neuroblastoma cells to the antineoplastic effect of ATRA. *Society for Endocrinology*, 699–710.

- Mirone, V., Fusco, F., Verze, P., Schulman, C., Debruyne, F., & Imbimbo, C. 2006. Androgens and Benign Prostatic Hyperplasia. *European Urology Supplements*, 5(4), 410–417.
- Migliaccio, A. 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *The EMBO Journal*, 19(20), 5406–5417.
- Mocellin, S., Rossi, C., Pilati, P., & nitti, D. 2005. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(1), 35–53.
- Mohammad, O., Nyquist, M., Schweizer, M., Balk, S., Corey, E., Plymate, S., Mostaghel, E. 2017. Supraphysiologic Testosterone Therapy in the Treatment of Prostate Cancer: Models, Mechanisms and Questions. *Cancers*, 9(12), 166.
- Moreno-Vega, A., Vega-Riveroll, L., Ayala, T., Peralta, G., Torres-Martel, JM, Rojas, J., Mondragón, P., Domínguez, A., De Obaldía, R. , Avecilla-Guerrero, C., Anguiano, B., Delgado-González, E., Zambrano-Estrada, X., Cuenca-Micó, O., De La Puente Flores, O., Varela-Echavarría, A., & Aceves, C. 2019. Adjuvant Effect of Molecular Iodine in Conventional Chemotherapy for Breast Cancer. Randomized Pilot Study. Estudio piloto aleatorizado. *Nutrients*. 11, 1623.
- Nava-Villalba, M., Nuñez-Anita, R. E., Bontempo, A., & Aceves, C. 2015. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Molecular Cancer*, 14(1).
- Negri-Cesi, P., Colciago, A., Poletti, A., & Motta, M. 1999. 5 $\alpha$ -reductase isozymes and aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *The Prostate*, 41(4), 224–232.
- Noordzij, M. A., van Steenbrugge, G. J., van der Kwast, T. H., & Schröder, F. H. 1995. Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Urological Research*
- Nojima, D., Li, L.-C., Dharia, A., Perinchery, G., Ribeiro-Filho, L., Yen, T.-S. B., & Dahiya, R. 2001. CpG hypermethylation of the promoter region inactivates the estrogen receptor- $\beta$  gene in patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 92(8), 2076–2083.



- Núñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, et al., 2009 Un complejo entre la 6-yodolactona y el tipo de receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas puede mediar en el efecto antineoplásico del yodo en el cáncer de mama. *Prostaglandinas Otros lípidos Mediat* . 89:34-42
- Ogino, Y., Miyagawa, S., & Iguchi, T. 2016. Testosterone/Dihydrotestosterone. *Handbook of Hormones*, 515– e94E–3.
- Olokpa E, Bolden A, Stewart LV. 2016. The Androgen Receptor Regulates PPAR $\gamma$  Expression and Activity in Human Prostate Cancer Cells. *J Cell Physiol*. 231, 2664-72.
- Olvera-Caltzontzin P., Delgado G., Aceves C., Anguiano B. 2013. Iodine Uptake and Prostate Cancer in the TRAMP Mouse Model. *Molecular Medicine*. 8,409-16.
- Pitulis, N. 2009. IL-6 and PPAR $\gamma$  Signalling in Human PC-3 Prostate Cancer Cells. *Anticancer Research*.
- Pravettoni, A., Mornati, O., Martini, PGV, Marino, M., Colciago, A., Celotti, F., Negri-Cesi, P. 2007. Estrogen receptor beta (ERbeta) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: studies on the possible mechanism of action in DU145 cells *Endocrinología molecular y celular*, 263,1-2, 46–54.
- Prins, G. S., & Korach, K. S. 2008. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73(3), 233–244.
- Quintero-García, M., Delgado-González, E., Sánchez-Tusie, A., Vázquez, 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.
- Rosen R., Altwein J., Boyle P. 2003. Lower urinary tract symptoms and male sexual dysfunction: the multinational survey of the aging male (MSAM-7). *Eur Urol*. 44, 637–649.
- Rybak A., Bristow R., Kapoor A. 2015. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*. 6, 1900–1919.

- Rojas Duran, F., Manzano Denes, J., Soto Cid, A. H., Aranda Abreul, G. E., Juárez Aguilar, E., Coria Ávila, G. A., Hernández Aguilar, M. E. 2011. The androgen receptor in the prostate physiopathology. *Neurobiología*.
- Rahman HP, Hofland J, Foster PA. 2016. In touch with your feminine side: how oestrogen metabolism impacts prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 23, 249–266.
- Siegel RL., Miller KD., Jemal A. 2016. Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30.
- Song W, Khera M. 2014. Physiological normal levels of androgen inhibit proliferation of prostate cancer cells in vitro. *Asian Journal Andrology*.
- Sumitomo, M., Tachibana, M., Nakashima, J., Murai, M., Miyajima, A., Kimura, F., Nakamura, H. 1999. An essential role for nuclear factor kappa b in preventing TNF-alpha-Induced Cell Death IN Prostate Cancer cells. *The Journal of Urology*, 161(2), 674–679.
- Srinivasan, S., Kumar, R., Koduru, S., Chandramouli, A., & Damodaran, C. 2010. Inhibiting TNF-mediated signaling: a novel therapeutic paradigm for androgen independent prostate cancer. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 15(2), 153–161.
- Smyth, PPA 2003. Papel del yodo en la defensa antioxidante en enfermedades de la tiroides y de la mama. *Biofactores*, 19(3-4), 121–130.
- Smyth MJ., Cretney E., Kershaw M. H., and Hayakawa Y. 2004. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological Reviews*. 275–293.
- Tan MH., Li J., Xu HE., Melcher K., Yong EL. 2015. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 3-23.
- Tian, J.-M., Ran, B., Zhang, C.-L., Yan, D.-M., & LI, X.-H. 2018. Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(3).
- Timms, B. G. 2008. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation* 76, 565–577

- Tse, B. W. C., Scott, K. F., & Russell, P. J. 2012. Paradoxical Roles of Tumour Necrosis Factor-Alpha in Prostate Cancer Biology. *Prostate Cancer*, 1–8.
- Vasto, S., Carruba, G., Candore, G., italiano, E., Di Bona, D., & Caruso, C. 2008. Inflammation and prostate cancer. *Future Oncology*, 4(5), 637–645.
- Van Hoesen, R., Ten Hagen, T., & Eggermont, A. 2006. TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *Oncologist*, 397–408.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. 1995. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol*
- Verze, P., Cai, T. & Lorenzetti, S. 2016. El papel de la próstata en la fertilidad, la salud y la enfermedad masculinas. *Nat. Rev.Urol.* 13, 379–386.
- Vignozzi, L., Gacci, M., & Maggi, M. 2016. Lower urinary tract symptoms, benign prostatic hyperplasia and metabolic syndrome. *Nature Reviews Urology*, 13(2), 108–119.
- Visvader JE. 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*. 469, 314–322.
- Wang, D., Montgomery, R. B., Schmidt, L. J., Mostaghel, E. A., Huang, H., Nelson, P. S., & Tindall, D. J. 2009. Reduced tumor necrosis factor receptor-associated death domain expression is associated with prostate cancer progression. *Cancer research*, 69(24), 9448–9456.
- Wen, S., Chang, H.-C., Tian, J., Shang, Z., Niu, Y., & Chang, C. 2015. Stromal Androgen Receptor Roles in the Development of Normal Prostate, Benign Prostate Hyperplasia, and Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology*, 185(2), 293–301.
- Weihua, Z., Lathe, R., Warner, M., & Gustafsson, J.-A. 2002. An endocrine pathway in the prostate, ER , AR, 5 -androstane-3,17 -diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13589–13594.
- Xiao, L., Luo, Y., Tai, R., & Zhang, N. 2019. Estrogen receptor  $\beta$  suppresses inflammation and the progression of prostate cancer. *Molecular Medicine Reports*.

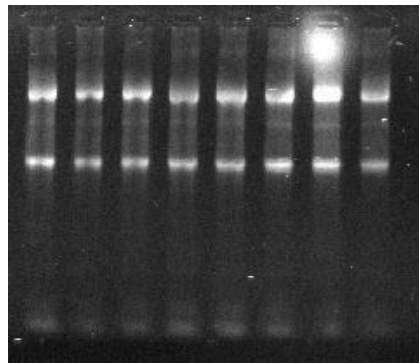
Xu, S., Yu, S., Dong, D., & Lee, L. T. O. 2019. G Protein-Coupled Estrogen Receptor: A Potential Therapeutic Target in Cancer. *Frontiers in Endocrinology*

Zhang, R., Zong, J., Peng, Y., Shi, J., Du, X., Liu, H., ... Zhang, J. 2021. GPR30 knockdown weakens the capacity of CAF in promoting prostate cancer cell invasion via reducing macrophage infiltration and M2 polarization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(9), 1173–1191.

Zlotta, A. R. et al.,. 2013. Prevalence of prostate cancer on autopsy: cross-sectional study on unscreened Caucasian and Asian men. *J. Natl Cancer Inst.* 105, 1050–1058

## 11. ANEXO

En la figura 1 se observa una imagen representativa de un gel de agarosa al 2% en la que se observa la electroforesis de muestras de RNA purificado a partir de células DU145. En la imagen superior se muestran las dos subunidades correspondientes al RNA ribosomal. En la tabla inferior se muestra algunos parámetros representativos de concentración y “pureza”. Cocientes 260/280 y 280/260 menores a 1.6 y mayores a 2 indican contaminación con proteínas o compuestos orgánicos como el fenol.

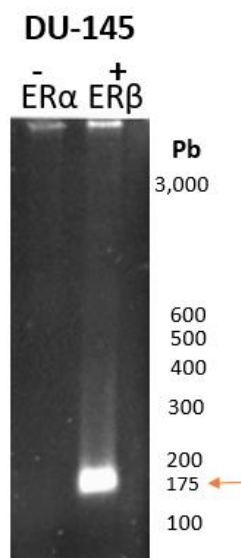


Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
1	1153	1.84	1.97
2	1161.6	1.81	1.99

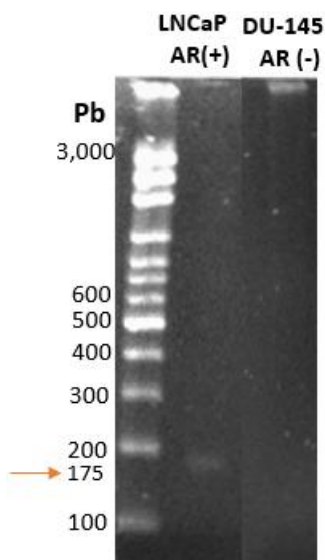
<b>3</b>	1135.9	1.85	1.93
<b>4</b>	1146.6	1.87	1.88
<b>5</b>	1504.1	1.86	2.16
<b>6</b>	1517.2	1.91	2.15
<b>7</b>	1500.6	1.81	2.07
<b>8</b>	1503.2	1.88	2.06
<b>9</b>	1063.8	1.79	2.02
<b>10</b>	1044.4	1.81	2.02
<b>11</b>	1606.3	1.82	2.07
<b>12</b>	1634.8	1.82	2.09
<b>13</b>	1646.7	1.91	1.9
<b>14</b>	1721.5	1.89	1.91
<b>15</b>	1480.9	1.82	2.05
<b>16</b>	1539.3	1.81	2.07

**Figura 1. Muestras y amplificación de RNA obtenido de la línea celular DU145.** Electroforesis de muestras de RNA obtenido a partir de células DU145. La Tabla inferior muestra el Análisis cuantitativo de concentración y pureza obtenidos a partir de un ensayo representativo de extracción.

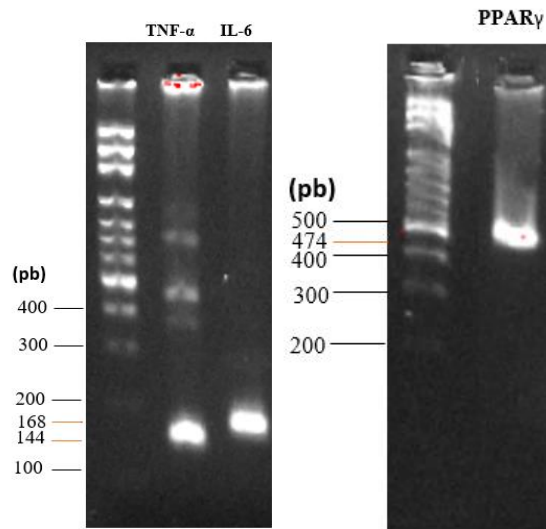
Por otra parte, se realizó un ensayo de PCR de tiempo final para analizar la presencia o ausencia de los receptores nucleares a estrógenos (*ERs*), andrógenos (*AR*), lípidos (*PPAR $\gamma$* ) y citocinas (*TNF- $\alpha$* , *IL6*). En la figura 2 se muestra una imagen representativa de un gel de agarosa, en la que se detecta la expresión del *ER $\beta$*  (151 pb), pero no la del *ER $\alpha$*  (170 pb). En la figura 3 se muestra que las células DU145 no expresan el *AR* (175 pb), pero sí las LNCaP (control positivo). En la figura 4 se muestra la expresión de *PPAR $\gamma$*  (474 pb), *TNF- $\alpha$*  (144 pb), *IL6* (168 pb).



**Figura 2. Expresión de los *ERs* en las células DU145.** Imagen representativa de un gel de agarosa en la que se observa el amplicón de 175 pares de bases (pb) que corresponde al *ERβ*, pero no el que correspondería al *ERα* (170 pb).



**Figura 3. Expresión del AR en las células LNCaP y DU145.** Imagen representativa de un gel de agarosa en la que se observa el amplicón de 175 pares de bases (pb), en las células LNCaP pero no DU145.



**Figura 4. Productos de amplificación de la PCR para la detección de la expresión de TNF- $\alpha$  IL6 y PPAR $\gamma$ .** Imagen representativa de un gel de agarosa en la que se observa el amplicón de 144 pb para TNF- $\alpha$ , 168 pb para IL6 y 474 pb para PPAR $\gamma$ , en las células DU145.